

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Si vous êtes en cotutelle internationale, remplissez ce champs en notant : Cotutelle internationale avec "nom de l'établissement", sinon effacer ce texte pour qu'il n'apparaisse pas à l'impression

Présentée et soutenue par :

MARLENE PASQUET

le jeudi 15 décembre 2016

Titre :

Mécanismes oncogéniques des mutations de GATA2 dans le développement
des syndromes myélodysplasiques et des leucémies aigües myéloïdes
familiales

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Equipe 16, IUCT-Oncopôle

Directeur/trice(s) de Thèse :

Mr Eric Delabesse

Jury :

Mr Thomas Mercher, rapporteur

Mr Regis Peffault de Latour, rapporteur

Mr Guy Leverger, examinateur

Mr Cyril Broccardo, examinateur

Mme Bettina Couderc, examinatrice

Mr Hervé Rubie, membre d'honneur

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Eric Delabesse qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire et de m'encadrer durant ce long parcours. Sa gentillesse et sa compétence m'ont permis d'avancer dans mon travail sereinement.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Regis Peffault de LaTour et Monsieur Thomas Mercher pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur Guy Leverger et Monsieur le Dr Hervé Rubie d'avoir eu la gentillesse de bien vouloir examiner mon travail de thèse.

Je remercie Monsieur Cyril Broccardo pour m'avoir aidée dans la conduite de ce travail; j'ai beaucoup apprécié ses qualités scientifiques et d'enseignement. Au-delà, ce fut l'occasion d'une belle rencontre.

Je souhaite également remercier l'ensemble de mes collègues du service d'Hématologie-Oncologie Pédiatrique pour avoir suppléé à mon travail durant ces 3 années, tout particulièrement Geneviève Plat, ainsi que ma secrétaire Marjorie Lafon.

Enfin, je tenais à remercier l'ensemble du personnel de l'équipe 16 du CRCT pour leur aide précieuse, tout particulièrement les ingénieurs de recherche Stéphanie Lagarde et Nais Prade qui ont su me supporter (..), ainsi que les techniciennes Alicia Carrette, Sylvie Hebrard et Nelly Rouquié. J'espère vivement pouvoir poursuivre mon travail à leurs côtés.

*Aux 2 générations qui me précèdent, à mes parents,
à ma grand-mère Catherine que j'admire
Pour leur soutien et leur amour*

A la génération future,

*To build may have to be the slow and laborious task of years.
To destroy can be the thoughtless act of a single day.*

Winston Churchill

Les hommes se trompent, les grands hommes avouent qu' ils se sont trompés.

Voltaire

Résumé

Depuis 2011, des mutations hétérozygotes germinales du gène *GATA2* ont été identifiées chez des patients et familles, associées à des maladies hématologiques (myélodysplasie (MDS), leucémie aiguë myéloblastique (LAM)), immunologiques (déficit en cellules B, NK et monocytes (DMLC syndrome)) et vasculaires (syndrome d'Emberger, associant MDS et lymphœdème) ¹⁻³. Le gène *GATA2* code pour un facteur de transcription comportant 2 doigts de zinc, essentiel dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices et des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

De nombreuses mutations différentes du gène *GATA2* ont été identifiées (mutations ponctuelles non-sens ou faux sens, larges délétions, délétions focales d'un enhancer dans l'intron 4) sans claire corrélation entre le génotype et le phénotype. Nous avons d'abord retrouvé, par séquençage des phases codantes (exome) au sein d'une famille de 4 patients suivis à Toulouse, une mutation *GATA2* R396Q. Dans un second temps, l'analyse d'une cohorte nationale a permis d'identifier des patients porteurs de mutations *GATA2* présentant des phénotypes cliniques de type DMLC, LAM et/ou MDS ⁴. Actuellement, plus de 80 patients ont été identifiés au niveau national.

Au niveau fonctionnel, nous avons initié l'analyse de 2 mutations ayant des conséquences clairement distinctes : la mutation R204X qui conduit à un codon stop dans le domaine précédant le premier doigt de zinc et la mutation ponctuelle R396Q, faux sens, située à la fin du deuxième doigt de zinc. Les modèles de différenciation *in vitro* en milieu semi-solide à partir de progéniteurs hématopoïétiques transduits par un vecteur rétroviral ont montré que les cellules transduites avec le mutant R396Q restent bloquées à un stade précoce de différenciation granulo-monocytaire, confirmé par l'analyse cytologique (aspect de myéloblastes). Le mutant R204X ne montre aucun effet différentiel en comparaison des cellules transduites par *GATA2* sauvage. Le mutant R396Q, à la différence du mutant R204X, peut induire une transformation leucémique des cellules *in vitro* lors de réensemencements sériels des progéniteurs transduits. Ces cellules peuvent être cultivées indéfiniment en milieu liquide sans cytokines, initiant une lignée leucémique. La localisation cellulaire de ces 2 protéines mutantes est distincte, nucléaire pour le mutant R396Q (identique à la protéine normale) et cytoplasmique pour le mutant R204X par perte probable du signal de localisation nucléaire. L'analyse transcriptomique a retrouvé un ensemble de gènes différentiellement exprimés entre le mutant R396Q et le gène sauvage.

Différents modèles animaux sont développés. Deux modèles murins, un de reconstitution hématopoïétique après transduction et un modèle knock-in inducible, sont en cours. La première expérience de reconstitution hématopoïétique n'a pas permis de mettre en évidence de phénotype leucémique après 6 mois de suivi, par probable rétention intramédullaire et différenciation terminale des cellules transduites. Nous avons également initié une collaboration permettant d'analyser l'effet des mutations de *GATA2* ou équivalents ontogéniques (*serpent*, *pannier*) dans la drosophile. Les protéines GATA sont ainsi très conservées au cours de l'évolution et dans la drosophile, les protéines de la famille GATA ont un rôle essentiel dans la différenciation du système hématopoïétique de cet animal.

Abstract

Since 2011, heterozygous germline *GATA2* mutations have been identified in patients and families associated with hematological (myelodysplasia (MDS), acute myelogenous leukemia (AML)), immunological (B cells, NK cells and monocytes deficiency (DMLC syndrome)) and vascular diseases (Emberger syndrome, combining MDS and lymphedema)¹⁻³. The *GATA2* gene encodes a transcription factor containing two zinc fingers critical for the regulation of the proliferation and differentiation of progenitor and hematopoietic stem cells (HSCs).

Many different *GATA2* mutations were identified (nonsense or missense point mutations, large deletions, focal deletions of an enhancer in intron 4) without clear correlation between genotype and phenotype. We first identified a R396Q mutation of *GATA2* by sequencing the coding frames (exome) of cells in a family of 4 patients followed in Toulouse. Then the analysis of a national cohort identified additional patients carrying *GATA2* mutations with various clinical phenotypes such as DMLC, AML and/or MDS⁴. Currently, over 80 patients have been identified at the national level.

Functionally, we initiated the analysis of 2 specific mutations with very distinct consequences: R204X a mutation leading to a stop codon before the first zinc finger and the R396Q a missense mutation located at the end of the second zinc finger. *In vitro* differentiation in semi-solid medium of hematopoietic progenitors transduced with a retroviral vector have shown that the cells transduced with the mutant R396Q remain blocked at an early stage of granulo-monocytic differentiation confirmed by cytological analysis (myeloblasts). The R204X mutant shows no differential effect compared to cells transduced with wild type *GATA2*. The R396Q mutant, unlike the R204X, can induce leukemic transformation of cells *in vitro* after serial re-seeding of transduced progenitors. These cells may be grown in liquid media without cytokines indefinitely, initiating a leukemia cell line. The cellular localization of these two mutant proteins is distinct, nuclear for the R396Q mutant (identical to the wild type protein) and cytoplasmic for the R204X mutant by probable loss of the nuclear localization signal. Transcriptomic analyses have shown differential gene expression between R396Q mutant and the normal gene.

Various animal models are developed. Two mice models, one of hematopoietic reconstitution after retroviral transduction and one inducible knock-in model, are ongoing. The first hematopoietic reconstitution experiment failed to demonstrate leukemic phenotype after 6 months of follow-up, likely by intramedullary retention and terminal differentiation of transduced cells. We have also initiated collaboration to analyze the effect of mutations of *GATA2* or equivalent ontogenetic genes (*serpent*, *pannier*) in *Drosophila*. GATA proteins are very well conserved during evolution and in *Drosophila*, the GATA family proteins have a critical role in the differentiation of the hematopoietic system.

Table des matières

Table des matières	3
Abréviations	5
Chapitre 1 - Introduction.....	6
Partie 1 - Hématopoïèse normale et pathologique.....	8
Hématopoïèse normale.....	8
Stroma et microenvironnement : notion de niche hématopoïétique.....	9
Régulation de l'hématopoïèse normale	10
Leucémogénèse.....	12
Partie 2- Leucémies aiguës myéloblastiques et myélodysplasies familiales	16
Généralités et épidémiologie	16
Formes syndromiques de LAM et MDS familiales.....	17
Mutations de <i>RUNX1</i> : désordre plaquettaire familial associé à un risque de développement de LAM et de MDS.....	20
Mutations de <i>CEBPA</i>	25
Autres cas de LAM/MDS familiales	29
Partie 3 - Les facteurs de transcription GATA	33
Les facteurs GATA hématopoïétiques : GATA1, GATA2 et GATA3	33
GATA1.....	35
GATA3.....	40
Partie 4 - GATA2	43
Transcrits <i>GATA2</i>	43
Protéines <i>GATA2</i>	47
Complexes protéiques de <i>GATA2</i>	48
Expression de <i>GATA2</i>	50
Fonction biologique in vivo (modèles murins)	58
Partie 5 - Mutations de <i>GATA2</i>	61

Mutations germinales de GATA2	61
Mutations somatiques de GATA2.....	63
Chapitre 2. Résultats	65
Article 1, Blood. 2013 Jan 31;121(5):822-9	68
Article 2, Analyse clinique, en préparation	69
Manifestations cliniques associées aux mutations germinales de GATA2	70
Mutations germinales de GATA2 : corrélations génotype-phénotype.....	70
Evolutivité temporelle, pénétrance, expressivité.....	70
Manifestations cliniques	71
Survie globale et évolution.....	77
Prise en charge thérapeutique des patients porteurs de mutations GATA2	78
Article 3, Biologie, en préparation	82
Analyse fonctionnelle des mutations germinales de GATA2.....	83
Travaux non publiés	89
Modèle drosophile	89
Modèle murin de reconstitution hématologique.....	92
Modèle murin knock-in (KI).....	94
Conclusion et perspectives.....	96
Annexes.....	101
Annexe 1, RHOP, volume 4 - N° 1, P. 13-24 - mars 2016.....	101
Annexe 2, Hématologie, volume 20, numéro 3, Mai-Juin 2014	101
Annexe 3, Correspondances en Onco-hématologie, 2013	101
Bibliographie	102

Abréviations

AA : aplasie médullaire

AGM = Aorte Gonade Mésonéphros

CBF : Core Binding Factor

CLP : progéniteurs communs lymphoïdes

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CLP : progeniteur lymphoïde commun

CMP : progéniteur myéloïde commun

DBD : domaine de liaison à l'ADN

FOG1 : Friend Of GATA1

GIHRD : Gata1 hematopoietic regulatory domain

GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GMP : progéniteur granulo-macrophagique

GVH : réaction du greffon contre l'hôte

IBMF : Inherited Bone Marrow Failure

ILC : Innate-like cell

IPSS : International Prognosis Scoring System

JMML : leucémie myélomonocytaire juvénile chronique

KI : knock-in

LAM : leucémie aigüe myéloblastique

LMC : leucémie myéloïde chronique

LSC : cellule souche leucémique

LZD : domaine riche en leucine

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

MEP : progéniteur erythroïde et megakaryocytaire

MDS : myélodysplasie

MLP : progéniteur lymphoïde multi-lignée

NLS : signal de localisation nucléaire

RHD : Runt Homology Domain

TA : domaine de transactivation

Zn : Zinc

Chapitre 1 - Introduction

Pour un clinicien, entreprendre un travail de recherche à partir de l'observation clinique de patients dont il a la charge représente une opportunité fabuleuse. J'ai pu initier mon travail de thèse dans ces conditions après l'observation d'une famille toulousaine chez laquelle les 3 enfants et leur mère présentaient un déficit immunitaire et des hémopathies myéloïdes familiales. Mon travail de thèse a consisté en l'identification des mutations du gène *GATA2* et l'étude des conséquences fonctionnelles de ces mutations germinales dans la leucémogénèse à partir de ces observations.

La première partie introductive de mon travail consistera à présenter les concepts généraux de l'hématopoïèse et de sa régulation normale et pathologique, puis de décrire les formes connues dans la littérature de leucémie aigüe myéloblastiques (LAM)/ myélodysplasie (MDS) familiales. Une troisième partie concernera la description des facteurs de transcription de la famille GATA, avant de s'attacher à une description plus large du facteur de transcription *GATA2* et de son rôle dans l'hématopoïèse normale. Une cinquième partie clôturera cette introduction en abordant les mutations *GATA2* décrites dans la littérature.

La publication initiale (Article 1) permettra de discuter des atteintes cliniques des patients ainsi que du travail initié sur le plan national pour le diagnostic et la prise en charge de ces patients.

Une publication rassemblant les 78 patients du registre est en cours de finalisation (Article 2) pour une soumission prochaine et sera présentée lors de la soutenance.

L'article 3 permettra d'ouvrir une discussion sur les mécanismes fonctionnels impliqués dans la leucémogénèse des mutations *GATA2* à partir des autres observations de la littérature. Je présenterais enfin mes données expérimentales non publiées avant de conclure sur les perspectives d'étude de ce gène et notamment les modèles murins développés dans le laboratoire.

En annexe, vous trouverez les revues rédigées durant ma thèse relatives aux mutations de *GATA2*.

Partie 1 - Hématopoïèse normale et pathologique

L'hématopoïèse représente le processus complexe de production des cellules sanguines au sein de la niche hématopoïétique.

Sa régulation est sous le contrôle de facteurs extrinsèques et intrinsèques (dont les facteurs de transcription).

Les dérégulations de l'hématopoïèse conduisant aux hémopathies myéloïdes reposent sur un modèle de coopération oncogénique.

Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est le processus de production des cellules sanguines qui garantissent les fonctions de respiration cellulaire par les globules rouges, d'hémostase par les plaquettes et d'immunité par les leucocytes. Chez les mammifères, lors de la vie intra-utérine, l'hématopoïèse primitive se déroule d'abord dans le sac vitellin puis se déplace vers le foie fœtal, la rate et la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques proviennent soit du sac vitellin, soit du mésoderme splanchnopleural (région AGM = Aorte Gonade Mésonephros), en clusters de cellules souches réparties au niveau de la partie ventrale de l'aorte dorsale et le long des principales artères ^{5,6}. L'hématopoïèse devient médullaire au début du développement des ébauches osseuses, pour se poursuivre exclusivement après la naissance dans la moelle osseuse.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont capables d'autorenouvellement et de différenciation en cellules des différentes lignées hématopoïétiques en fonction du type de stimulation qu'elles reçoivent, avant de donner des éléments matures circulant dans le sang. L'hématopoïèse normale est finement régulée par des facteurs extrinsèques (essentiellement les facteurs de croissance hématopoïétiques provenant du microenvironnement) et des facteurs intrinsèques (les facteurs de transcription), relais des facteurs de croissance, dont l'expression est tissu- et temps dépendante, comme PU.1, RUNX1, CEBPA et les facteurs GATA ⁷. Mes travaux de thèse se sont intéressés à la caractérisation du facteur de transcription hématopoïétique, GATA2, élément clef dans la régulation de l'auto-renouvellement et de la différenciation des CSH et des cellules progénitrices et nouvellement impliqués dans la leucémogenèse myéloïde.

Dans un modèle classique d'hématopoïèse, les CSH se différencient soit en progéniteur myéloïde (donnant naissance aux progéniteurs mégacaryocytaires MEP et granulo-

macrophagiques GMP-DC), soit en progéniteur lymphoïde, ce dernier donnant naissance aux cellules dendritiques, NK, lymphocytes T et B. Dans un modèle plus récent, Doulatov et al. ont mis en évidence un progéniteur commun lymphoïde multi-lignée (MLP) pouvant donner naissance aux cellules B, T et NK mais aussi aux cellules dendritiques, monocytes ou macrophages (Figure 1). Ce modèle est intéressant dans la physiopathologie des mutations du gène *GATA2*, comme nous le verrons ultérieurement.

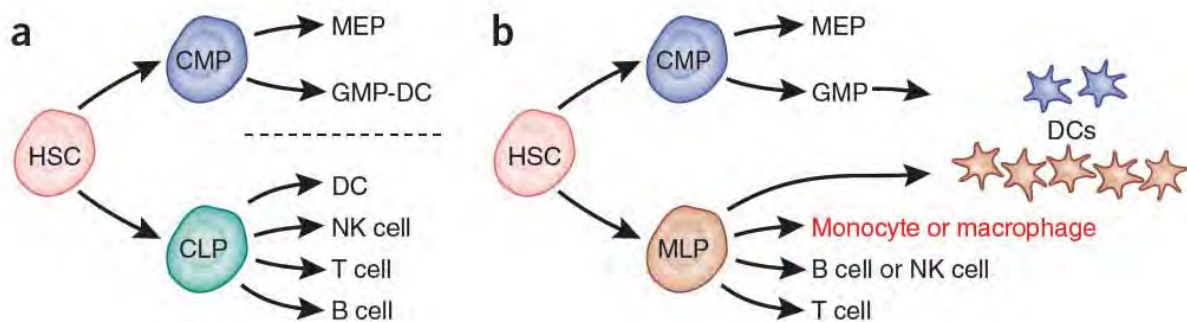


Figure 1. Hématopoïèse normale. a. Modèle classique de séparation entre progéniteur myéloïde et lymphoïde ; b. Modèle présenté par Doulatov et al ^{8,9}. MEP= progéniteur érythroïde et mégacaryocytaire ; CMP= progéniteur commun myéloïde ; CLP= progéniteur commun lymphoïde ; MLP= progéniteur lymphoïde multi-lignée ; GMP= progéniteur granulo-macrophagique.

Stroma et microenvironnement : notion de niche hématopoïétique

Afin de se renouveler, de proliférer et de se différencier, les CSH vivent dans un environnement constitué de différents types cellulaires et protéines matricielles : les constituants de cet environnement interagissent entre eux et avec les CSH et l'ensemble constitue la niche hématopoïétique. Cette niche est constituée par une matrice extracellulaire qui rassemble un complexe de protéines fibreuses, glycoprotéines et protéoglycanes qui sont produites par les cellules stromales : cellules mésenchymateuses, fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales, adipocytes et ostéoblastes. Ces cellules sécrètent la matrice extracellulaire permettant l'adhésion des cellules souches en particulier grâce au collagène, et sécrètent des facteurs de croissance [Stem Cell factor (SCF), thrombopoïétin (TPO), angiopoïétin 1 (ANGPT1), chemokine stromal-derived factor 1(SDF1 ou CXCL12)] permettant les processus physiologiques cellulaires. Les interactions stroma - cellules hématopoïétiques permettent la circulation des différentes cellules de l'hématopoïèse (immatures et matures) dans le tissu myéloïde. Les expériences

de délétion ou d'inactivation fonctionnelle chez la souris de cellules essentielles à la niche entraînent une diminution du nombre de CSH, confirmant leur rôle essentiel dans la niche ¹⁰.

Pour maintenir une capacité de production de cellules sanguines matures tout au long de la vie, la plupart des CSH restent quiescentes en phase G0 et n'entrent dans le cycle cellulaire que sous l'influence de facteurs stimulants pour s'engager dans une voie de différenciation cellulaire, la cellule perd alors ses capacités d'autorenouvellement. La quiescence permet aussi l'adhésion à la niche et la protection vis à vis des agressions extérieures. Cette activité d'autorenouvellement est associée à une activité télomérase qui limite le raccourcissement des télomères durant la division cellulaire ¹¹.

Régulation de l'hématopoïèse normale

Facteurs extrinsèques (Facteurs de croissance et cytokines)

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des molécules cruciales pour la survie, la différenciation, la multiplication et la maturation des cellules de l'hématopoïèse. Le premier facteur de croissance isolé a été l'érythropoïétine (EPO), cloné chez l'Homme en 1985 ¹². Depuis, de nombreux autres facteurs ont été découverts, clonés et synthétisés.

A l'exception de l'EPO synthétisée principalement par le cortex rénal, ces facteurs sont synthétisés par un grand nombre de cellules présentes dans divers organes : les cellules constituant le stroma cellulaire (cellules endothéliales, fibroblastes) et les cellules hématopoïétiques (monocytes/macrophages, lymphocytes). Elles portent aussi le nom de cytokine et pour celles synthétisées par les lymphocytes, de lymphokines et interleukines (IL). Ces cytokines reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques.

En fonction de leur site d'action au cours de l'hématopoïèse, on distingue schématiquement 3 types de facteurs de croissance :

- Les facteurs de promotion : ils permettent l'engagement des cellules souches dans le cycle cellulaire et sensibilisent les CSH multipotentes à l'action des autres facteurs de croissance. Ce sont principalement l'IL1, l'IL4, l'IL-6 et le SCF (Stem Cell Factor), FLT3-ligand et LIF (Leukemia Inhibiting Factor) qui interviennent dans les stades précoces de l'hématopoïèse.

- Les facteurs multipotents : ils permettent la survie et la différenciation des CSH lorsque celles-ci ont été sensibilisées par les facteurs de promotion. Ce sont principalement l'IL-3 et le GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor).
- Les facteurs restreints : ils agissent sur les cellules souches engagées en favorisant la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Cet effet est limité à une lignée cellulaire. Ce sont principalement le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor, lignée granuleuse), le M-CSF (monocyte colony-stimulating factor lignée monocytaire), l'IL7 (lignée lymphoïde B), l'IL-5 (lignée granuleuse et éosinophile), l'IL-4 (lignée granuleuse basophile), l'IL-6 (lignée mégacaryocytaire), l'EPO (lignée érythroïde) et la TPO (thrombopoïétine mégacaryocytaire).

D'autres facteurs ont un effet inhibiteur sur l'hématopoïèse : par exemple, le TGF β (Transforming growth Factor β) inhibe la croissance des progéniteurs précoces.

Facteurs intrinsèques (Facteurs de transcription)

Dans l'hématopoïèse, les facteurs de transcription jouent un rôle central dans la différenciation cellulaire, en agissant comme activateurs ou répresseurs transcriptionnels. Ils agissent à deux niveaux, soit en reconnaissant des séquences d'ADN cis-régulatrices au niveau du promoteur des gènes, soit en se liant à des protéines partenaires de manière spécifique, permettant une liaison indirecte sur une séquence d'ADN. Il existe des facteurs généraux de transcription qui se lient à l'ADN polymérase et permettent d'initier la transcription et des facteurs plus spécifiques et inductibles selon un schéma très précis dans l'hématopoïèse. Typiquement, les facteurs de transcription n'agissent pas seuls mais au sein d'un complexe global avec d'autres facteurs de transcription, des modificateurs chromatinien et des protéines co-facteurs. Au delà des techniques de biologie moléculaire « classiques », l'analyse par immunoprécipitation chromatinienne (ChIP) a permis de mieux comprendre comment ces facteurs interagissaient entre eux et sur quelles séquences du génome ¹³. Le séquençage ChIP (Immunoprécipitation chromatinienne) est une méthode basée sur le séquençage de fragments ADN-protéine immunoprécipités, ce qui permet de déterminer les sites de liaison de l'ADN sur le génome pour une protéine particulière et donne accès à une représentation des interactions protéine–ADN qui ont lieu dans le noyau

de la cellule. Appliquée aux facteurs de transcription, dont la localisation est nucléaire, elle apporte ainsi des informations importantes et distinctes d'une analyse transcriptomique, sur les cibles et le recrutement d'autres protéines co-facteurs.

Dans l'hématopoïèse, les facteurs de transcription GATA sont essentiels aux capacités d'autorenouvellement des CSH, ainsi qu'à l'engagement dans une lignée hématopoïétique précise grâce à une régulation fine de leur niveau d'expression, comme nous le verrons plus loin.

Leucémogénèse

Concepts généraux

Dans un certain nombre de cas, les cellules souches hématopoïétiques peuvent acquérir ou perdre des fonctionnalités à la suite des mutations des gènes critiques à la différenciation hématopoïétique. Ces mutations s'accumulent avec l'âge et peuvent entraîner une transformation maligne de ces cellules donnant lieu, entre autres, à des myélodysplasies (MDS) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ¹⁴. Les MDS résultent d'une atteinte clonale de cellules souches hématopoïétiques conduisant à une hématopoïèse inefficace et évoluant dans certains cas en LAM. Les LAM sont caractérisées par un blocage de la différenciation cellulaire au cours de la maturation myéloïde avec une prolifération de ces cellules.

Une des hypothèse principale repose sur le fait que ces CSH transformées ont toujours une possibilité d'autorenouvellement et de différenciation dans un modèle dérégulé donnant naissance à terme aux LSC (cellules souches leucémiques) ^{10,15}. Les cellules souches leucémiques peuvent soit provenir de la dérégulation de CSH ou du compartiment des cellules progénitrices.

Les lésions génétiques à l'origine de ces transformations impliquent souvent des molécules de signalisation cellulaire (dont de nombreux facteurs de transcription) comme JAK2, RAS, FLT3, KIT et plus récemment GATA2. Ces mutations entraînent l'acquisition de signaux de croissance autonomes pour la cellule leucémique, et altèrent la réponse des LSC aux signaux de régulation de l'environnement, et notamment de la niche. Par exemple les cellules souches leucémiques peuvent devenir insensible aux signaux Notch et TGFβ (Transforming growth factor β) dans des modèles murins de LAM et de leucémie myéloïde chronique ^{16,17}. D'un autre côté, la niche en elle-même peut être soumise à des modifications par

majoration de la production de cytokines pro-inflammatoires, et à des dérégulations des voies Notch et Wnt notamment, notamment au niveau des cellules endothéliales et souches mésenchymateuses, supportant le développement d'une hématopoïèse maligne (pour revue ¹⁰).

Concept de coopération oncogénique

Le concept d'événements génétiques agissant en collaboration a initialement été développé par Knudson ¹⁸. Plus récemment, cette théorie a été adaptée par Gilliland ¹⁹, qui a divisé ces altérations génomiques en deux catégories selon le modèle de coopération oncogénique : les mutations de classe I et les mutations de classe II.

Les mutations de classe I confèrent un avantage prolifératif ou de survie aux cellules hématopoïétiques grâce à l'activation constitutive de signaux de transduction menant à des signaux prolifératifs et antiapoptotiques. L'hyper-expression de ces mutations est généralement suffisante pour induire un désordre myéloprolifératif chez la souris.

On retrouve dans cette classe :

- les protéines tyrosines kinases qui sont activées soit par la fusion avec une protéine partenaire ou par une mutation activatrice dans leur domaine kinase ou par une répétition dans leur domaine juxta-membranaire (par exemple FLT3, KIT) ;
- les mutations activatrices de RAS (NRAS, KRAS, HRAS, protéines GTPases).

Les mutations de classe II sont caractérisées par une dérégulation de la différenciation et un autorenouveau des précurseurs hématopoïétiques mais ne donnent pas directement un avantage prolifératif et ne sont donc pas suffisantes pour induire une leucémie chez la souris. La plupart sont des mutations perte de fonction de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique normale.

Les réarrangements PML-RAR α [t(15;17)(q22;q21)], AML1-ETO [t(8;21)(q22;q22)], CBFB-MYH11 [inv(16)(p13q22)/ t(16;16)(p13;q22)] et 11q23/MLL sont considérés comme des réarrangements de type II.

La coopération de ces deux types de mutations semble être nécessaire pour aboutir à la survenue d'une leucémie aiguë : les mutations de type II modifient la capacité du précurseur à se différencier mais sont en général insuffisantes pour aboutir à une leucémie. Si une mutation de type I apparaît, un signal prolifératif est alors fourni ce qui aboutit à l'apparition

de la leucémie aiguë myéloïde. Kim et al ont montré dans un modèle murin de reconstitution hématopoïétique que l'association de mutations de FLT3 avec une inversion du chromosome 16 permettait une coopération oncogénique ²⁰. La mise en évidence du rôle de la mutation de gènes impliqués dans la régulation épigénétique (notamment *TET2*, *EZH2*, *DNMT3A*, *ASXL1* et *IDH1/2*) a permis d'élargir et de complexifier ce modèle initial ²¹. L'identification de ces cibles moléculaires a permis de développer des thérapies « ciblées » sur ces voies d'activation, récemment FLT3 dans les LAMs et JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs.

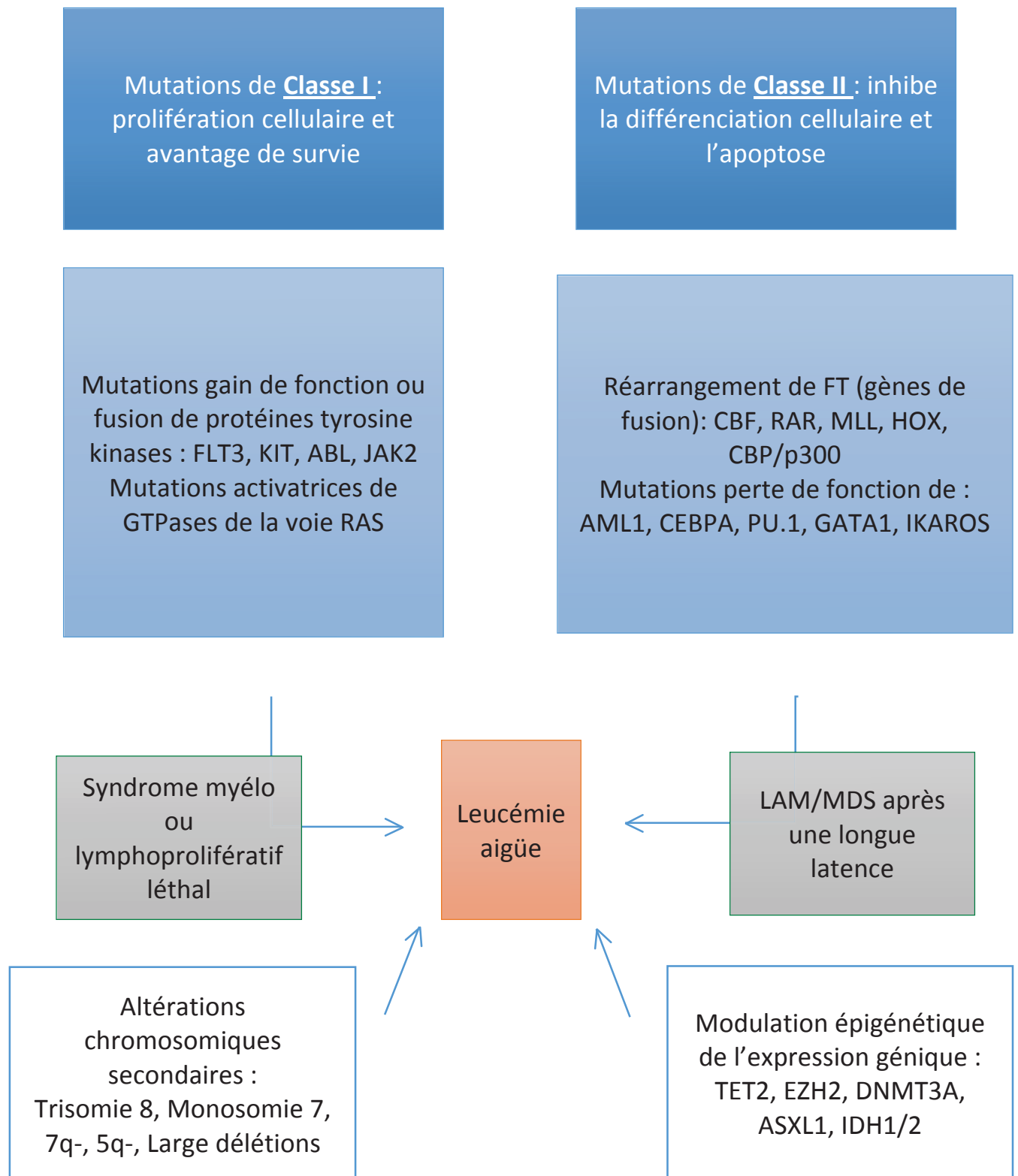


Figure 2. Modèle de coopération oncogénique d'après Kelly et al., Conway O'Brien et al. et Chalandon et al.^{19, 22, 21}. En gris les conséquences observées dans les modèles murins. FT= facteur de transcription

Partie 2- Leucémies aiguës myéloblastiques et myélodysplasies familiales

Les LAM et MDS familiales sont des maladies rares regroupant des formes syndromiques pédiatriques et des formes dites familiales pures (mutations de RUNX1, CEBPA et GATA2).

Les mutations germinales de RUNX1 et CEBPA, leur rôle et la structure clonale de la transformation leucémique seront développés ici.

D'autres cas de LAM/MDS familiales sont liés soit à une monosomie du 7, soit à des mutations de gènes nouvellement décrits (ANKRD26, DDX41, ETV6 et SPR72).

Généralités et épidémiologie

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont caractérisées par l'association d'un blocage du programme de différenciation myéloïde et d'une prolifération incontrôlée de ces cellules immatures. Les myélodysplasies (MDS) sont des hémopathies clonales de la cellule souche hématopoïétique (CSH), caractérisées par une prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de manière anormale (= dysmyélopoïèse). L'apoptose excessive des précurseurs aboutit à un défaut de production et à des cytopénies périphériques (= hématopoïèse inefficace). Ces hémopathies myéloïdes sont le plus souvent sporadiques et leur prévalence augmente avec l'âge.

Chez l'enfant, les leucémies représentent en France 500 nouveaux cas par an soit 30 à 35% des pathologies malignes. Elles sont aiguës dans 80% des cas, et à l'intérieur de ces leucémies aiguës, les LAM représentent environ 20%. L'incidence standardisée des cas de LAM et de MDS chez l'enfant de moins de 15 ans est de 7,4 cas par an et par million d'habitants (Lacours B., données du registre national des hémopathies de l'enfant, 2010). Chez l'adulte, l'incidence augmente progressivement avec l'âge, le taux d'incidence standardisé est autour de 4,9 (LAM) et de 4,7 (MDS) nouveaux cas par an pour 100 000 personnes en Europe et aux Etats-Unis (INVS, rapport 2012).

Les LAM familiales (LAMf) et les MDS familiales (MDSf) sont des maladies rares dont il est impossible de définir une fréquence précise. Son exploration reste complexe en de nombreux points. D'une part, la rareté de cette maladie rend difficile le diagnostic et la collecte des données cliniques, et parmi ces patients, l'issue fatale des atteintes

hématologiques rend l'étude encore plus restreinte à un tout petit nombre d'entre eux. Ainsi, Holmes *et al.* en 2012 ont pu caractériser génétiquement seulement 10 patients sur 27 par une technique de séquençage ciblé de gènes connus comme étant impliqués dans la survenue de LAMf ²³. En routine, tous les laboratoires d'hématologie ne recherchent pas l'ensemble des mutations et moins de 20% des familles peuvent prétendre à un diagnostic génétique ²⁴. D'autre part, la pénétrance de ces maladies est souvent incomplète avec l'existence de porteurs sains et d'une latence clinique variable. Aussi, la variabilité du phénotype au sein d'une même famille est le témoin d'une variabilité génétique probablement plus large que les mutations connues et héritées au sein d'une même famille. Enfin, le coût et le temps nécessaire pour les explorations biologiques d'un faible nombre de patients restent des éléments limitants, même si le coût de ces techniques a bien diminué et que des efforts sont réalisés pour encourager la recherche sur ces pathologies rares.

Néanmoins, au-delà de la nécessité de reconnaître ces cas familiaux pour une meilleure prise en charge clinique, suivi et conseil génétique, l'existence de plusieurs membres atteints au sein de la même famille représente un modèle unique d'étude des mutations prédisposant aux hémopathies malignes myéloïdes. Sur le plan démographique, ces patients sont souvent diagnostiqués à un âge plus jeune que les individus présentant une maladie sporadique, avec au moins un apparenté du premier degré présentant une anamnèse de LAM/MDS ²⁴.

De nombreux gènes sont impliqués dans la survenue de LAMf et MDSf. La plupart des familles décrites dans la littérature ont des profils de transmission de type autosomique dominant et sont nommées « formes familiales pures » par opposition aux formes syndromiques ²⁵. Ces dernières ne seront pas détaillées dans cette introduction, seuls les gènes associés aux formes « familiales pures », dont *RUNX1* et *CEBPA* seront détaillés dans cette partie. *GATA2*, impliqué depuis 2011 dans les LAMf et MDSf, fera l'objet d'un paragraphe distinct.

Formes syndromiques de LAM et MDS familiales

Les pathologies associées à un risque de développement d'hémopathies malignes myéloïdes sont nombreuses et peuvent être regroupées comme suit (Table 1) :

- Les formes associées à une insuffisance médullaire [Inherited Bone Marrow Failure (IBMF) syndromes], parmi lesquelles l'anémie de Blackfan Diamond, les formes congénitales de neutropénie et d'amégacaryocytose, et le syndrome de Schwachman

Diamond. La dyskératose congénitale prédispose à un risque d'hypoplasie médullaire, mais aussi à un risque de MDS, voire de LAM à l'âge adulte ^{26,27}.

- Les déficits de réparation de l'ADN, essentiellement l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom et le syndrome de Li Fraumeni ^{28,29}.
- Des mutations liées à la perte d'un gène suppresseur de tumeur comme *NF1*, dans un modèle de « double hit » décrit pour la première fois dans le rétinoblastome familial par Knudson ^{18,30}. Ces altérations de la transduction du signal peuvent aussi être en cause dans les leucémies myelomonocytaires juvéniles observées dans le syndrome de Noonan par altération de gènes de la voie RAS/MAPK.
- Enfin le syndrome de Down lié à la trisomie 21 prédispose aux hémopathies myéloïdes, notamment aux LAM mégacaryocytaires mais aussi lymphoïdes (LAL). Dans les LAM, une mutation de *GATA1* survenue *in utero* semble induire la première étape du phénotype leucémique.

	Transmission	Gene	Locus	Incidence
LAM/MDS syndromiques familiales				
Syndromes d'aplasie médullaire				
Anémie de Blackfan Diamond	AD	RPS19	19q13	0,5-1%
	AD	RPS24	10q22	
	AD	RPS17	15q25	
	AD	RPL5	1p22	
	AD	RPL11	1p35	
	AD	RPL35A	3q29	
	AD	RPS7	2p25	
Neutropénie sévère congénitale	AD	ELA2	19q13	10%
	AD	GFI1	1p22	
	AD	HAX1	1q21	
Thrombopénie congénitale amégacaryocytaire	AR	MPL	1p34	?
Syndrome de Shwachman Diamond	AR	SBDS	7q11	10%
Dyskératose congénitale	XL	DKCI	Xq28	3-5%
	AD	TERC	3q26	
	AD	TERT	5p15	
	AD	TINF2	14q11	
	AR	NOP10	15q14	
		NHP2	5q35	
Syndromes liés à un déficit de la réparation de l'ADN				
Anémie de Fanconi	AR, XL	Voies FANC/BRCA		50%
Syndrome de Bloom	AR	BLM	15q26	
Li Fraumeni	AD	TP53	17p13	
Anomalies de la transduction du signal				
Syndrome de Noonan	AD	Voies RAS/MAPK		?
Neurofibromatose de type 1	AD	NF1	17p11	0,2-0,5%
Aneuploïdie				
Trisomie 21	Sporadique		21	2,50%
MDS familiales pures				
Risque d'hémopathie myéloïde non syndromique	AD	CEBPA	19Q13	?-80%
Atteinte plaquettaire avec risque accru d'hémopathies myéloïdes	AD	RUNX1	21q22	20-60%
Délétions du chromosome 21q22	AD	RUNX1	21q22	?
Atteinte des télomères (dyskératose congénitale occulte)	AD	TERC	3q26	?
	AD	TERT	5p15	?
Monosomie 7 familiale	AD	GATA2?	3q26	?

Table 1. Formes syndromiques de LAM/MDS, d'après Liew et al.³¹

Mutations de *RUNX1* : désordre plaquettaire familial associé à un risque de développement de LAM et de MDS

RUNX1

RUNX1 est une sous-unité du facteur de transcription « Core Binding Factor » (CBF), régulateur transcriptionnel composé de 2 sous unités, alpha et beta. Les mammifères possèdent 3 gènes codant pour la sous unité α (*RUNX1*, *RUNX2* et *RUNX3*) et 1 codant pour la sous unité β , *CBFB* ³². Les sous-unités α reconnaissent une séquence spécifique (TGYGGT) permettant une liaison directe à l'ADN via le domaine nommé RHD (Runt Homology Domain) de 128 acides aminés, alors que la sous unité β doit d'abord se dimériser avec les sous-unités α avant leur liaison à l'ADN ³³.

RUNX1 (connu également comme *AML1* et *CBFA2*) est situé en 21q22. Il est exprimé principalement dans le cerveau, les reins, le pancréas, le cœur, le foie et la rate. Dans le système hématopoïétique, *RUNX1* est exprimé principalement dans les cellules souches hématopoïétiques, les mégacaryocytes et les lymphocytes T ³⁴. *RUNX1* régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'hématopoïèse, comme le récepteur au M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) ³⁵, les sous-unités α et β du récepteur des lymphocytes T, le GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) ³⁶, la myéloperoxydase ³⁷ et l'élastase neutrophile ³⁸.

Mutations germinales de *RUNX1*

Les mutations germinales de ce gène sont associées à un désordre plaquettaire familial autosomique dominant avec une propension à développer des hémopathies myéloïdes de type LAM et MDS. La première description clinique d'une famille franco-canadienne présentant une thrombopénie familiale avec hémopathies malignes myéloïdes remonte à 1985 ³⁹. Ensuite de nombreuses descriptions cliniques de pédigrées familiaux ont suivi permettant une meilleure compréhension du phénotype clinique et biologique ^{31,40}.

Ces formes familiales sont caractérisées par une tendance hémorragique depuis l'enfance associée à une thrombopénie modérée à volume plaquettaire normal et des signes de thrombopathie ^{41,42}. Les anomalies plaquettaires qualitatives sont caractérisées par un défaut d'agrégation plaquettaire au collagène et à l'épinéphrine, de manière similaire aux effets de l'aspirine, et par un défaut de libération des granules denses gamma au sein des

plaquettes. Les patients ayant une délétion totale du gène semblent avoir des taux de plaquettes significativement plus bas que les autres. Il n'existe pas de caractéristiques cytologiques ou cytogénétiques spécifiques ^{41,42}. Certaines familles peuvent présenter une dysmégacaryopoïèse médullaire avec la présence de micro-mégacaryocytes immatures préfigurant une évolution leucémique proche ⁴³.

L'implication du locus 22q1.1 dans ces formes familiales de thrombopénie remonte à 1996 ⁴⁴ et l'implication de *RUNX1* (*CBFA2*) dans cette pathologie date de 1999 suite à la mise en évidence de délétions et de mutations ponctuelles non-sens, faux sens et décalant le cadre de lecture (6 pédigrées) principalement au niveau du domaine RHD, modifiant des acides aminés essentiels pour l'hétérodimérisation et la liaison à l'ADN ⁴⁵. L'analyse des cellules souches médullaires et des cellules périphériques montrant un défaut de clonogénèse mégacaryocytaire *in vitro*, un modèle d'haploinsuffisance a été initialement proposé ⁴⁵. Michaud *et al.* ⁴⁶ ont ensuite décrit 3 nouveaux pédigrées comprenant des mutations en dehors du domaine RHD (au niveau du domaine de transactivation). Moins de 50 pédigrées ont été rapportés dans la littérature à ce jour ⁴⁰, principalement des mutations ponctuelles du domaine RHD, mais aussi en C terminal ⁴⁷, ainsi que des délétions complètes du gène ^{31,47-49} (Figure 3). Plus récemment, des délétions ou duplications partielles du gène *RUNX1* ont été mises en évidence par MLPA chez 2 familles présentant le même phénotype ⁵⁰.

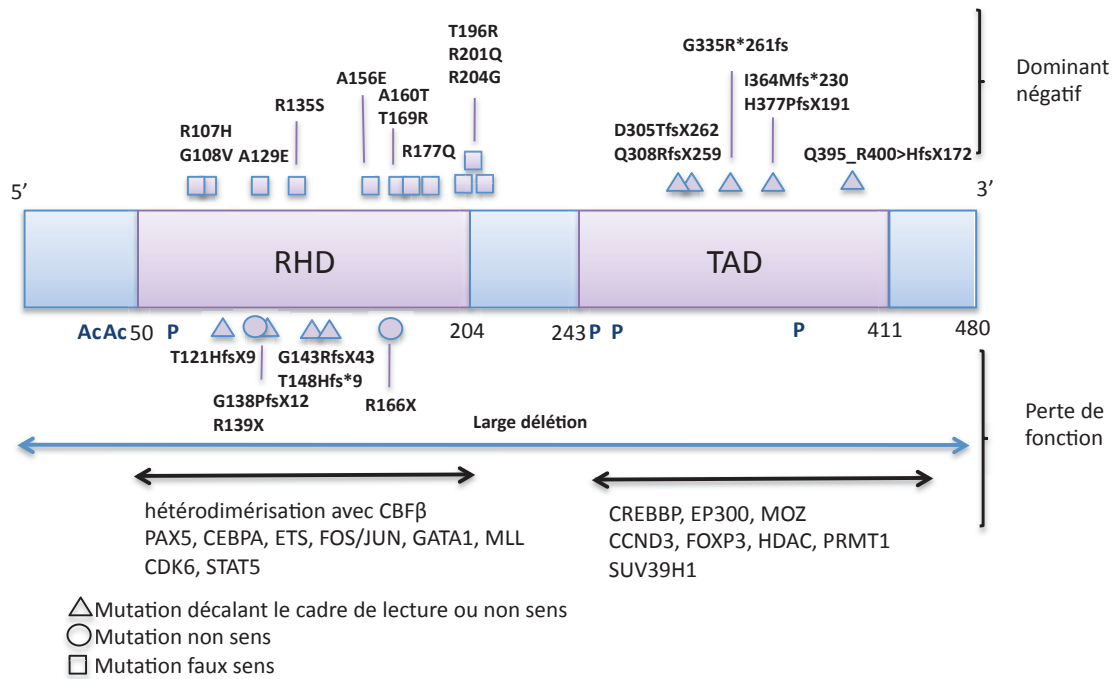


Figure 3. Structure de la protéine RUNX1, co-facteurs protéiques et localisation des mutations germinales, d'après Latger-Cannard et al, Preudomme et al, Antony-Debré et al^{43, 49, 55}. Les conséquences fonctionnelles prédites sont mentionnées. RHD= domaine homologue à Runt ; TAD= domaine de transactivation. Les modifications posttraductionnelles concernent les Lys24, Lys43 (acétylation), les Ser63, Ser249, Ser266 et Ser393 (phosphorylation)

Churpek et al. ont montré que le risque d'évolution sous forme de LAM ou de MDS pouvait atteindre 80% à l'âge de 50 ans dans ces formes⁵¹ (Figure 4).

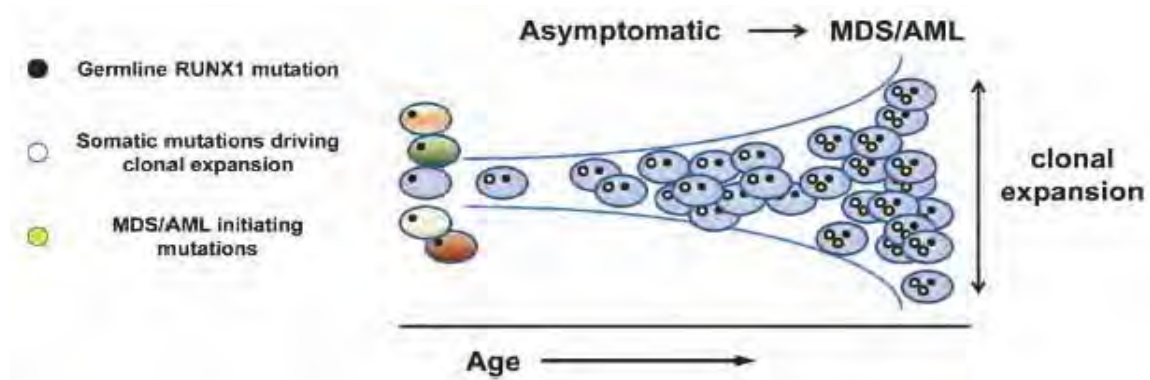


Figure 4. Modèle d'évolution clonale dans les LAM/MDSf liée à une mutation germinale de RUNX1⁵¹.

Les analyses fonctionnelles initiales *in vitro* de 7 mutants situés sur le domaine RHD ont permis de montrer l'existence d'une altération dans la capacité de liaison à l'ADN, diminuée ou complètement abolie, les mutants non-sens et faux sens gardant leur capacité d'hétérodimérisation avec CBFB, et agissant de manière dominante négative sur la protéine sauvage dans un essai de gène rapporteur. La colocalisation du mutant avec son partenaire CBFB dans le cytoplasme pourrait expliquer l'effet inhibiteur du mutant. A l'inverse les mutants décalant le cadre de lecture semblent agir par haploinsuffisance comme cela a été observé pour les délétions du gène ⁴⁶. Ces études *in vitro* n'ont cependant pas pu déterminer l'importance fonctionnelle des mutations additionnelles nécessaires à l'acutisation.

En effet, parmi les 8 patients étudiés en détail au stade leucémique de leurs maladies, Preudhomme *et al.* ont ensuite pu démontrer qu'un deuxième évènement génétique était nécessaire dans la majorité des cas de FDP/AML (6/8) pour la progression leucémique ⁴⁷. D'autres études récentes décrivent ainsi l'acquisition de mutations somatiques de *RUNX1* mais également d'*ASXL1*, de *CDC25A*, de *CEBPA*, d'*IDH1*, de *TET2* et de *CEPBA* ⁵²⁻⁵⁴. En effet, une étude récente menée dans le laboratoire d'Hana Raslova sur 25 individus provenant de 15 familles présentant ce désordre plaquettaire familial a mis en évidence l'existence d'un deuxième évènement soit sur le deuxième allèle de *RUNX1*, soit dans des gènes suppresseurs de tumeur, régulateurs épigénétiques ou de voies de signalisation chez tous les patients progressant vers une LAM, élément non retrouvé chez les patients évoluant vers une LAL T ⁵⁵. A partir d'un modèle cellulaire utilisant des cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes du derme adultes (iPSC), la même équipe a pu démontrer que le niveau d'expression de *RUNX1* était essentiel à la leucémogénèse : la délétion de *RUNX1* induit un phénotype thrombopénique seul alors que la mutation R174Q, ayant un effet dominant négatif, entraîne une expression très faible de *RUNX1*, déstabilisant le compartiment granulomonocytaire et majorant l'instabilité génomique à l'origine d'un phénotype leucémique ⁵⁶.

Modèles murins

L'inactivation du gène *Runx1* chez la souris montre un développement embryonnaire initial normal de la vascularisation du sac vitellin et de l'érythropoïèse. Cependant, les embryons meurent entre les jours 11,5 et 12,5 de gestation par défaut d'hématopoïèse au niveau du

foie fœtal, engendrant un syndrome hémorragique majeur, notamment au niveau du système nerveux central⁵⁷⁻⁵⁹.

Runx1 semble contribuer à la régulation de la spécification des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de l'hématopoïèse définitive, les foyers hématopoïétiques de la région Aorte-Gonade-Mésonephros (AGM) étant absents chez les embryons *Runx1*^{-/-}⁶⁰. La contribution de *Runx1* à la mise en place d'une hématopoïèse adulte a pu être étudiée dans un modèle de délétion conditionnelle chez la souris, afin d'éviter la létalité précoce. On observe juste après la naissance, une diminution modérée des plaquettes (par défaut de maturation des mégacaryocytes), un blocage dans le développement lymphocytaire T et B et une expansion des progéniteurs hématopoïétiques sans altération réelle de la maintenance des CSHs adultes^{61,62}. On observe également une splénomégalie progressive, une expansion du compartiment myéloïde, des cytopénies périphériques et un nombre majoré de cellules immatures dans la moelle osseuse⁶³.

Les atteintes hématologiques des souris *Runx1*^{+/-} sont discrètes^{57,59} avec cependant une hypersensibilité au G-CSF, résultant en un blocage de différenciation et une expansion des cellules myéloïdes, pouvant refléter une propension à développer une hémopathie myéloïde⁶⁴.

Prise en charge

Le dépistage des apparentés et le conseil génétique sont essentiels dans cette pathologie, certains patients pouvant ne pas présenter de thrombopénie et/ou celle-ci peut apparaître plus tardivement^{40,43}.

La thrombopénie est généralement modérée, ne nécessitant pas d'intervention thérapeutique particulière. Notamment, les menstruations, la grossesse et l'accouchement chez les femmes ne semblent pas s'accompagner de problèmes hémorragiques majeurs. Le suivi de ces patients à un stade pré-leucémique est crucial mais complexe nécessitant une surveillance par numération formule sanguine et myélogramme répétés, dans une pathologie où le phénomène d'anticipation génétique est bien connu sans qu'il ne soit possible de proposer de traitement préemptif.

Le risque majeur est lié au risque d'évolutivité en hémopathie clonale. La reconnaissance précoce de cette évolution par analyse régulière de la moelle osseuse permettrait en théorie de pouvoir proposer un traitement plus précoce. Le seul traitement curatif des hémopathies

myéloïdes repose actuellement sur l'allogreffe de moelle, le caractère germinal rendant la sélection d'un donneur intrafamilial plus complexe. Des cas de transplantation avec un apparenté porteur de la mutation germinale ont été décrits, appelant à une grande prudence dans la recherche de donneurs intra-familiaux ⁶⁵.

Mutations de CEBPA

CEBPA

CEBPA fait partie de la famille des protéines « CCAAT enhancer-binding protein » (CEBPs), dont les 6 membres ont en commun une région bZIP riche en acides aminés basiques de type leucine. Le gène CEBPA ne possède pas d'intron et est localisé en 19q13 ⁶⁶. Ce facteur de transcription possède un transcrit et 2 isoformes de 30 et 42 kDa respectivement, l'isoforme de 30 kDa possédant 117 acides aminés de moins que l'isoforme 42 kDa ⁶⁷ (Figure 5). CEBPA est exprimé principalement dans les progéniteurs myéloïdes, et lors de la différenciation terminale hématopoïétique, notamment granulocytaire. Son expression est également retrouvée dans les adipocytes, les cellules de la peau, de l'intestin, du foie, du poumon, de la glande mammaire, de l'ovaire, de la prostate et du placenta ⁶⁸.

Comme tout facteur de transcription, CEBPA possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD) en C-terminal conservé parmi les membres de la famille CEBP ⁶⁹. Il contient un domaine bZIP riche en leucine, nécessaire à la dimérisation avec lui-même, d'autres membres de la famille CEBP ou d'autres facteurs de transcription. Cette région est aussi impliquée dans l'association avec d'autres facteurs de transcription comme PU.1, c-JUN, RUNX1 et ETS1 ^{69,70}. La protéine a 3 domaines de transactivation N terminaux (TA), qui peuvent interagir avec des modificateurs de la transcription (P300, TFIIB), des régulateurs du cycle cellulaire (E2F, CDK2/4) ou de la chromatine (SWI/SNF) ^{71,72}.

Des modifications post-traductionnelles de CEBPA peuvent survenir à titre de phosphorylation au niveau des sérines-21, 193 et 248 ⁷³, des thréonines-226 et 230 ⁷⁴, de sumoylation et enfin d'ubiquitinylation conduisant à sa dégradation (Figure 5). Les étapes de phosphorylation sont indispensables à l'activité transcriptionnelle. Par exemple, la phosphorylation de CEBPA au niveau de la sérine-21, conséquence de l'activation de la tyrosine kinase FLT3 fréquemment dupliquée dans les LAM, inhibe la fonction de CEBPA en modifiant sa structure conformationnelle et favorise le développement de LAM en bloquant la

différenciation granulocytaires^{75,76}. E6AP, une ubiquitine ligase de la famille E3, régule négativement l'expression de CEBPA dans la lignée K562, en dégradant les 2 isoformes p30 et p42 et perturbant ainsi le rapport protéique, élément fréquemment observé dans les LAM. Les capacités de transactivation de CEBPA sont aussi altérées dans ce modèle⁷⁷.

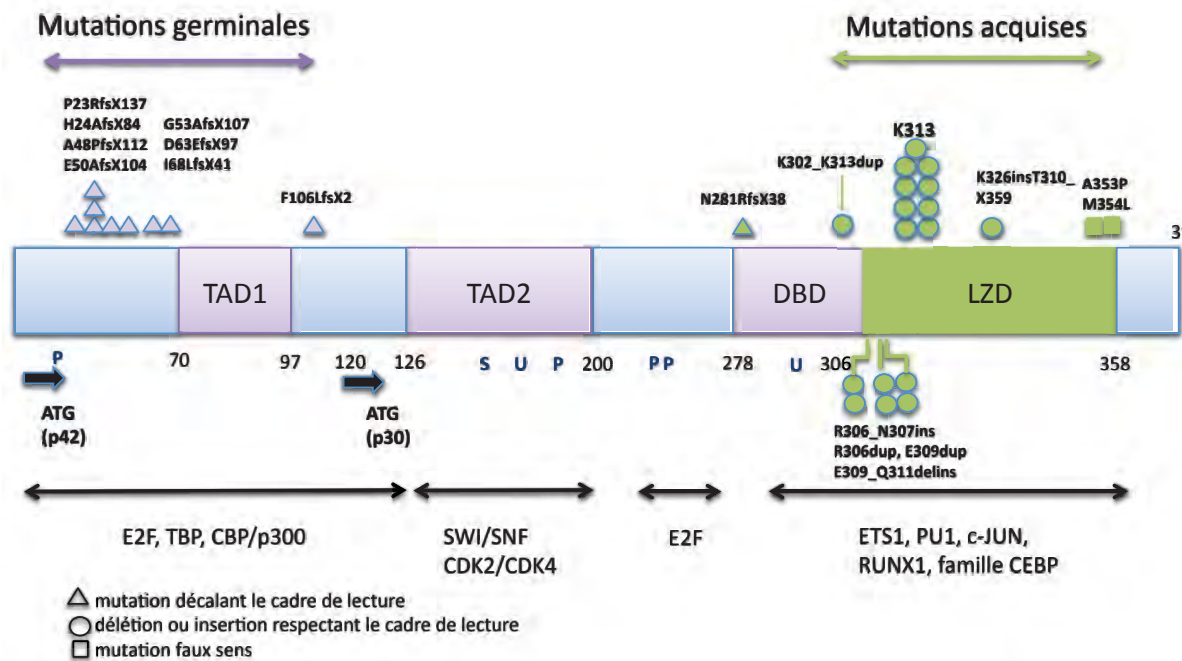


Figure 5. Structure de la protéine CEBPA, domaines fonctionnels, cofacteurs protéiques. Représentation schématique des mutations germinales et acquises dans les LAMf, d'après Tawana et al.⁸⁶. DBD= domaine de liaison à l'ADN, TAD= domaine de transactivation, LZD= domaine riche en leucine. Les modifications post traductionnelles concernent les Ser21, Ser190, Thr226 et Thr230 (phosphorylation permettant la liaison avec les co-facteurs) et les Lys161 et 313 (ubiquitination).

Mutations de CEBPA

Des mutations acquises de CEBPA sont retrouvées dans 7 à 15% des LAM à caryotype normal, avec le plus souvent des mutations doubles (CEBPAdm). Dans ce cas, le pronostic de la LAM est très favorable⁷⁸. Ces mutations sont également retrouvées dans 4% des MDS⁷⁹. Ces doubles mutations combinent en général une première mutation conduisant à un décalage du cadre de lecture en 5', phénomène aboutissant à la seule traduction de l'isoforme de 30 kDa. Une seconde mutation est retrouvée en 3' de type délétion ou insertion respectant le cadre de lecture, modifiant la capacité de la protéine soit à se fixer sur l'ADN, soit à se dimériser. Ces mutations somatiques sont souvent associées à des

mutations de *WT1* ou de *GATA2*^{80,81}. Les hémopathies avec des mutations uniques sont plus rares.

A côté de ces mutations somatiques, des mutations germinales de *CEBPA* ont été également identifiées (Figure 5). Ces mutations sont situées en 5' conduisant par décalage du cadre de lecture à une protéine de 42 kDa tronquée au profit de l'isoforme de 30 kDa. Cette dernière a une activité dominant-négative sur l'isoforme complet de 42 kDa^{82,83}. Aussi, en modulant positivement l'expression de l'isoforme de 30 kDa chez la souris, Kirstetter *et al.* ont pu mettre en évidence l'effet dominant négatif sur l'isoforme de 42 kDa par formation d'hétérodimères altérant les capacités de transactivation de la protéine et aboutissant à une granulopoïèse anormale⁸⁴. L'évolution vers la transformation repose également sur l'acquisition de mutations secondaires somatiques touchant la partie 3' du gène sur le deuxième allèle^{82,85}.

La progression de la maladie est maintenant mieux comprise grâce aux nouvelles techniques de séquençage (Figure 6). Il n'existe pas forcément une séquentialité des événements additionnels dans le même sous-clone mais certains sous-clones peuvent évoluer par mutation somatique de novo. L'acquisition de mutations somatiques partagées au sein des membres d'une même famille semble être un trait partagé avec le modèle de leucémogénèse des LAMf par mutation de *RUNX1*^{54,86}.

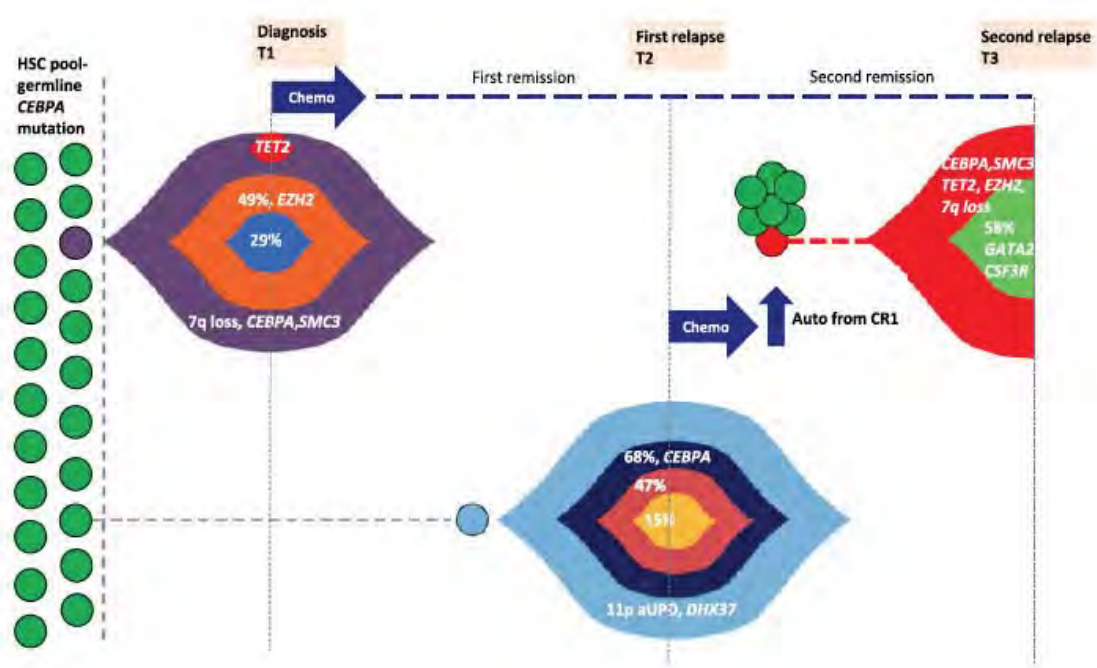


Figure 6. Exemple de structure clonale de leucémogénèse dans les mutations de *CEBPA* familiales⁸⁶.

Modèles murins

L'étude des fonctions hématopoïétiques du gène *CEBPA* a bénéficié de l'inactivation homozygote (KO) du gène chez la souris : les souris *Cebpa*^{-/-} ne produisent pas de granulocytes matures, de précurseurs granulo-macrophagiques (GMP) ni d'adipocytes, alors que la lignée érythroïde est majorée⁸⁷⁻⁸⁹. Les CSHs de ces animaux ont une capacité d'auto-renouvellement et de repopulation majorée par rapport aux cellules sauvages, sans pouvoir donner naissance à des GMPs (granulocyte-macrophage progenitor) à partir de progéniteurs multipotents⁹⁰. *Cebpa* est réprimé dans les progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires (megakaryocyte-erythroid progenitor, MEP) et surexprimé dans les GMP afin de permettre la différenciation granulo-macrophagique⁹¹. Ce rôle est possible par ses capacités de régulation de l'expression de nombreux gènes myéloïdes, notamment les gènes codant pour les récepteurs de facteurs de croissance granulo-monocytaires (G-CSFR, M-CSFR et GM-CSFR).

La transplantation de progéniteurs hématopoïétiques surexprimant CEBPA chez la souris favorise la différenciation myéloïde au détriment de la lignée érythroïde⁸⁸. L'ensemble de ces observations témoignent de l'importance de la dose de CEBPA dans la différenciation hématopoïétique.

Les modèles murins possédant des mutations bialléliques de CEBPA en 5' et 3' du gène permettent de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques. Les mutations présentes en 5' interfèrent avec l'homéostasie normale des CSHs, notamment en induisant la prolifération des cellules mutées, et en modifiant le programme transcriptionnel par répression des gènes myéloïdes. Le modèle leucémique connu dans les *dmCEBPA* est reproduit dans ce modèle : en effet, les mutations en 5' sont fréquemment associées à des mutations en 3', mutations en elles-mêmes n'ayant aucun rôle sur la prolifération des CSHs mais sur l'engagement des cellules pré-leucémiques vers des précurseurs myéloïdes^{84,92}. Il s'agit de la description d'un modèle de leucémogénèse sans impact pronostic étudié.

Phénotype clinico-biologique

Les mutations germinales de CEBPA sont retrouvées dans des formes de LAM/MDS familiales à transmission autosomique dominante, avec une pénétrance quasi-complète⁸⁶. La première description clinique remonte à 2004 avec 3 personnes affectées par une LAM sur 2 générations, puis de nombreuses descriptions de cas familiaux ont suivi^{85,93}. Si

initialement l'existence de porteurs sains était réfutée, les dernières familles décrites font état de l'existence de rares porteurs sains entre la deuxième et la quatrième décade, témoignant d'une pénétrance intra- et interfamiliale variable. L'âge de présentation peut être précoce, dès la petite enfance jusqu' à la quatrième décade, avec un âge médian au diagnostic autour de 25 ans. En opposition avec les autres syndromes de prédisposition aux LAM, l'hémopathie n'est pas précédée d'une phase de cytopénie ou de dysplasie.

La corrélation clinico-biologique est plus précise que pour les LAM/MDS liés à une mutation de *RUNX1* avec une prédominance de LAM de type M1/M2 dans la classification FAB, une expression fréquente du CD7 et un caryotype souvent normal (absence de monosomie 7 en particulier).

Prise en charge

Le pronostic de ces hémopathies est difficile à définir compte tenu du faible nombre de cas. Un travail collaboratif européen récent a montré sur une cohorte de 23 patients que la survie globale était autour de 70% à 10 ans, comparable aux LAM sporadiques avec une double mutation de CEBPA (CEBPAdm) et supérieure à celle des LAM avec une simple mutation (CEBPAsm)^{82,86,94}. Ces patients ont une incidence de rechute élevée, un peu plus de la moitié rechutant dans les 10 ans, soulignant la nécessité d'un suivi prolongé. Ces hémopathies familiales restent chimiosensibles, même après plusieurs rechutes. L'intérêt de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques est difficile à préciser, entre une toxicité importante de la greffe et la chimiosensibilité des rechutes.

Autres cas de LAM/MDS familiales

Monosomie 7 familiale

De nombreux cas de monosomie 7 totale ou partielle ont été rapportés comme étant associés à des formes « pures » de LAM/MDS familiales^{95,96}. L'origine du chromosome 7 perdu peut être soit paternelle soit maternelle, démontrant l'existence d'un événement secondaire recurrent n'impliquant pas le chromosome 7. La plupart des cas ont été maintenant identifiés comme associés à des formes de neutropénie congénitale ou à des mutations germinales du facteur de transcription GATA2, la monosomie 7 étant bien reconnue comme un « second évènement » dans le processus de leucémogénèse^{96,97}.

Cependant certains cas restent inexpliqués, de transmission autosomique dominante probable, et les hémopathies chez ces patients se développent souvent dès l'enfance⁹⁸.

Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire telles que le séquençage d'exome par séquençage de nouvelle génération, permet d'apporter un éclairage nouveau. De nouveaux gènes ont été décrits récemment dans des cas familiaux de LAM/MDS comme *ANKRD26*, *SRP72*, *ETV6* et *DDX41*⁹⁹⁻¹⁰².

ANKRD26

Les mutations du gène *ANKRD26* (ankyrin repeat domain 26) prédisposent à la survenue d'une thrombopénie modérée sans risque hémorragique, et à des hémopathies myéloïdes : sur les 222 patients rapportés dans la littérature, 4,9% ont développé une LA, 2,2% une MDS et 1,3% une leucémie myéloïde chronique (LMC)¹⁰¹. Les mutations sont principalement localisées dans la région 5' du gène *ANKRD26*, entraînant une absence de fixation normale des facteurs RUNX1 et FLI1, et ne permettant pas la répression d'*ANKRD26*, essentielle à la maturation terminale mégacaryocytaire¹⁰³. Les mécanismes de leucémogénèse ne sont pas connus.

DDX41

Habituellement, les prédispositions aux hémopathies malignes surviennent à un jeune âge. Une étude portant sur 15 patients au sein de familles de LAM/MDSf, essentiellement érythroblastiques, d'âge de révélation identique aux hémopathies sporadiques, autour de la 6^{ème} décennie, a identifié des mutations germinales de *DDX41*^{100,102} (Figure 7). Ces patients présentent aussi une prédisposition aux lymphomes et aux LAL et LMC, ainsi qu'une dérégulation immunologique avec une prédisposition aux granulomes. *DDX41* code pour une DEAD-box RNA hélicase. Les mutations de *DDX41* sont hétérozygotes, entraînant pour la majorité un décalage du cadre de lecture, donnant lieu à une protéine tronquée ou absente et suggérant un mécanisme d'haploinsuffisance. Certaines mutations sont des mutations ponctuelles faux sens, avec une pénétrance de la maladie plus forte et un âge de révélation plus précoce, suggérant un mécanisme physiopathologique différent. La moitié des patients développant des hémopathies familiales acquièrent une mutation sur le deuxième allèle, suggérant que ce gène peut agir comme un suppresseur de tumeur. La structure clonale de cette maladie a permis de retrouver des mutations somatiques de *TP53*, *RUNX1* et *DNMT3A*

chez ces patients. Les variations perte de fonction de *DDX41* retrouvées par un autre groupe semblent s'associer avec certaines hémopathies somatiques mais être aussi présentes à une fréquence non négligeable dans la population générale posant la question de l'imputabilité réelle de ces mutations dans ces pathologies ¹⁰⁴.

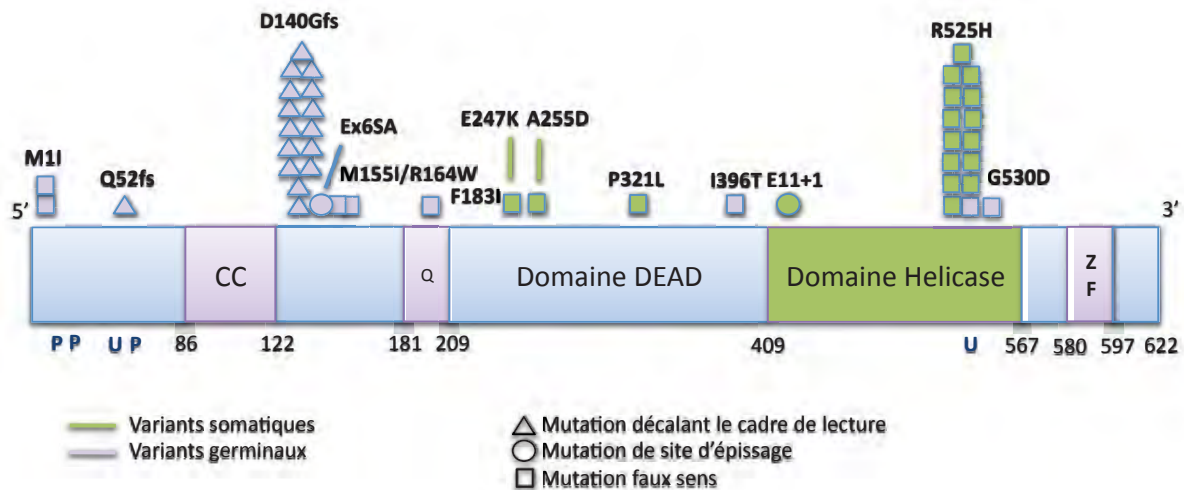


Figure 7. Représentation schématique des mutations germinales et somatiques de *DDX41* dans les LAM/MDSf, d'après Lewinsohn et al. ¹⁰⁰. Les modifications post-traductionnelles concernent les Ser4, Ser21, Pro17, Ser23, Tyr33, Ser66, Ser68 (phosphorylation) et les Lys49 et Lys538 (ubiquitination). ZF=doigt de Zinc ; Q=motif Q, CC=Coiled coil

ETV6

Les mutations germinales d'*ETV6* de transmission autosomique dominante peuvent être associées à des hémopathies myéloïdes mais aussi lymphoïdes familiales, précédées par une thrombopénie à l'instar des mutations de *RUNX1* ¹⁰⁵. Les mutations faux sens décrites sont situées principalement au niveau des domaines conservés ETS et dans la région située entre ces deux domaines (*internal linker*), entraînant un défaut de liaison à l'ADN, altérant la localisation subcellulaire de la protéine et agissant aussi de manière dominante négative sur la régulation de ses gènes cibles.

SRP72

Kirwan et al. ont identifié par séquençage d'exome 2 familles ayant des hémopathies familiales de type MDS et aplasie médullaire (AA), des mutations hétérozygotes de *SRP72* de transmission autosomique dominante. *SRP72* est un composant du « *signal recognition particle* », qui permet l'adressage des protéines vers le réticulum endoplasmique avant leur transfert membranaire ou extracellulaire. Les mutations hétérozygotes de *SRP72* semblent

perturber la localisation subcellulaire de la protéine et ses capacités de liaison avec 7SLRNA au sein du complexe protéique. Le rôle exact de ces mutations dans le développement de MDS/AA reste cependant à déterminer ⁹⁹.

Existe-t-il d'autres gènes impliqués dans les LAM et MDS familiales?

Tous les cas familiaux sont loin d'être caractérisés génétiquement. Une étude très récente portant sur 59 patients et 17 familles a montré que seulement 30% des familles pouvaient prétendre à un diagnostic génétique, sur la base du séquençage de 12 gènes classiquement impliqués dans les LAM/MDS de l'enfant ⁵¹.

Partie 3 - Les facteurs de transcription GATA

Les 6 facteurs de transcription GATA sont très conservés durant l'évolution et essentiels à la régulation génique grâce à leur structure en doigt de Zn.

Les facteurs GATA hématopoïétiques (1, 2 et 3) permettent une régulation fine de l'hématopoïèse.

GATA1 joue un rôle capital dans la différenciation érythroïde, mastocytaire et mégacaryocytaire.

GATA3 est un acteur principal de la lymphopoïèse T, mais aussi B, NK et NKT.

Les premières caractérisations de ces facteurs de transcription ont été réalisées dans les années 1980 et 1990 ^{106,107}. La famille des facteurs de transcription GATA comprend 6 membres chez les vertébrés, caractérisés par leur capacité à se lier à des régions d'ADN de type (A/T)GATA(A/G) [WGATAR], présentes au niveau de promoteurs ou d'enhancers de nombreux gènes, fonctionnant comme des activateurs transcriptionnels dans des essais de gènes rapporteurs.

Les protéines GATA ont été nommées selon leur ordre de découverte chronologique. Trois membres de la famille GATA sont impliqués préférentiellement dans les tissus hématopoïétiques : GATA1, GATA2 et GATA3 ^{6,106}. Les facteurs GATA4, GATA5 et GATA6 sont exprimés préférentiellement dans les tissus dérivés de l'endoderme et du mésoderme, principalement le tissu musculaire lisse, l'épithélium digestif, le testis et l'urothélium ¹⁰⁸.

Ces protéines sont caractérisées par la présence de 2 doigts de zinc (Zn) très conservés durant l'évolution au sein des mammifères, oiseaux et amphibiens ¹⁰⁹. Les 2 doigts de Zn ont des cibles et des fonctions différentes : le doigt de Zn C-terminal se lie sur les zones consensus GATA tandis que le doigt de Zn N-terminal a subi des modifications durant l'évolution et permet l'interaction avec d'autres co-facteurs protéiques ¹¹⁰⁻¹¹².

Les facteurs GATA hématopoïétiques : GATA1, GATA2 et GATA3

Outre les deux domaines à doigt de Zn, les facteurs GATA hématopoïétiques possèdent 2 domaines de transactivation en N et C-terminal (pour revue ¹¹³).

Les premiers travaux démontrant l'importance des motifs GATA au sein des régions promotrices ont porté sur les gènes de l'hémoglobine, puis sur un grand nombre de gènes

impliqués dans l'érythropoïèse¹¹⁴⁻¹¹⁶. On retrouve des motifs GATA non seulement sur les régions promotrices à l'initiation de la transcription mais aussi au niveau d'enhancers et de « *locus control region* » (LCRs)^{106,117}. Ultérieurement les mêmes motifs ont été mis en évidence dans des gènes impliqués dans la mégacaryopoïèse, les mastocytes et les cellules endothéliales¹¹⁸. Plus récemment les études en séquençage ChIP ont permis d'avoir une analyse et une idée plus précise de l'occupation des facteurs GATA dans le génome et notamment de l'occupation différentielle des protéines GATA1 et GATA2 (Figure 8A).

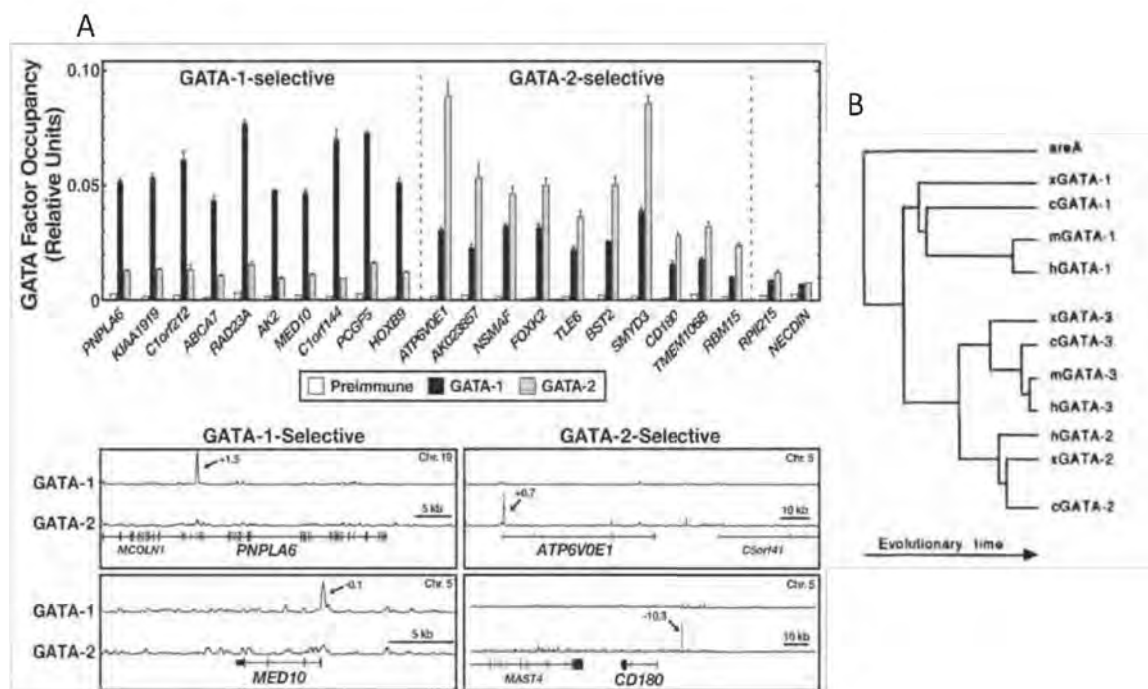


Figure 8. A. Analyse et représentation en séquençage ChIP des cibles différentielles de GATA1 et GATA2 dans les cellules K562¹⁴¹. B. Arbre phylogénétique des protéines GATA hématopoïétiques selon leur degré d'homologie, c(chicken), h(human), m(mouse), x(xenopus)¹⁰⁶.

Les protéines GATA sont caractérisées comme nous l'avons vu par leur capacité de liaison à l'ADN conférée par les 2 doigts de Zn. Quelques acides aminés seulement diffèrent à ce niveau entre les 3 protéines GATA hématopoïétiques conduisant à des fonctions distinctes et spécifiques. De ce point de vue, GATA2 et GATA3 ont une homologie plus grande par rapport à GATA1 (Figure 8B).

Les gènes GATA hématopoïétiques ont un profil d'expression spécifique. Leurs fonctions ont été précisées grâce aux modèles murins éliminant ces gènes par recombinaison homologue, montrant des actions différentes dans le contrôle de l'hématopoïèse, avec cependant

quelques redondances ¹¹⁹. Notamment, il est possible de restaurer une différenciation hématopoïétique chez les souris *Gata1*^{-/-} en exprimant un des gènes *Gata1*, *Gata2* ou *Gata3* sous le contrôle des éléments régulateurs de *Gata1* ¹²⁰.

GATA1

Expression de GATA1

Le gène *GATA1*, localisé sur le chromosome X, possède 5 exons ainsi qu'un premier exon non traduit ¹²¹. Des premiers exons alternatifs utilisés dans les cellules de Sertoli (IT) ont été décrits chez les rongeurs, en amont du principal premier exon hématopoïétique-spécifique IE ¹²². La structure et l'expression hématopoïétique de GATA1 sont conservées dans les vertébrés inférieurs, comme la poule, le xenope et le zébrafish ¹²³.

GATA1 est fortement exprimé dans les cellules érythroïdes primitives et terminales, les mastocytes et les mégacaryocytes, plus faiblement dans les cellules hématopoïétiques totipotentes et les cellules de Sertoli au niveau des testicules ¹²⁴⁻¹²⁸. *GATA1* est exprimé à la fois dans les CSHs, les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les progéniteurs de type MEP, les niveaux d'expression restant faibles à l'exception des MEP ¹²⁹. Le niveau d'expression de *GATA1* est finement régulé durant la différenciation cellulaire (Figure 9).

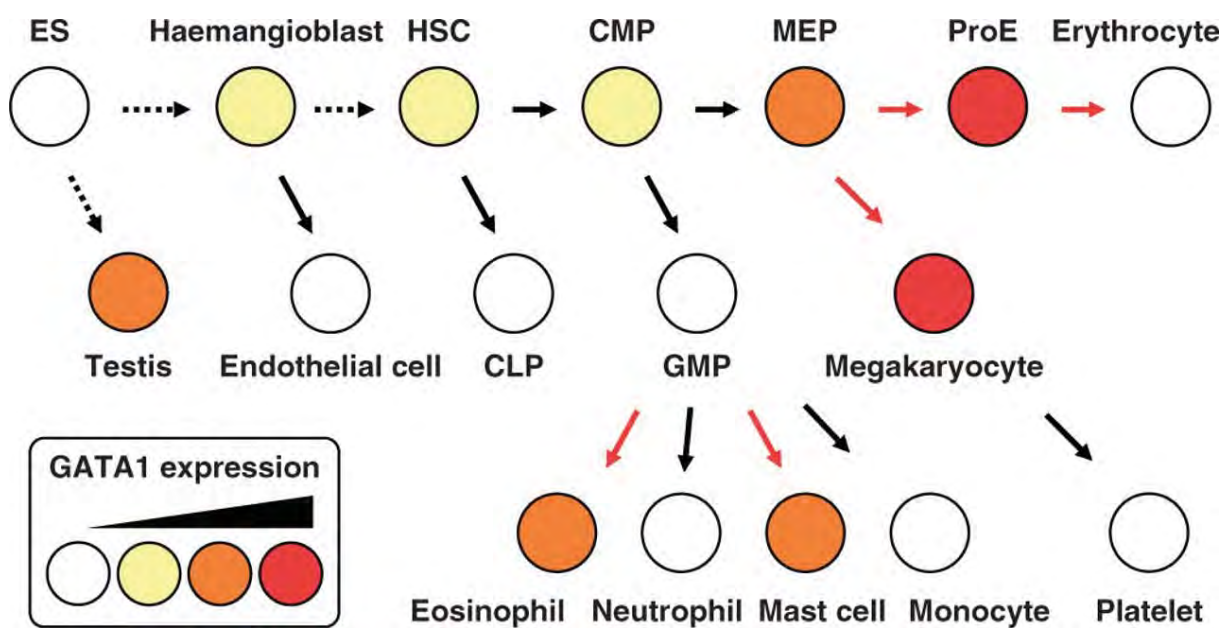


Figure 9. Niveaux d'expression de GATA1 durant la différenciation hématopoïétique physiologique ¹³⁰.

GATA1 est un élément essentiel de la régulation de gènes spécifiques de l'érythropoïèse primitive et définitive ^{125,131}. Comme *GATA1* est localisé sur le chromosome X, l'inactivation de ce gène chez la souris dans les cellules ES males confère un bon modèle d'analyse d'inactivation du gène. Les cellules *Gata1*^{null} ne permettent pas un développement érythroïde au-delà du stade de proérythroblaste *in vitro* et ne contribuent pas à la génération d'une érythropoïèse mature dans des modèles chimériques ^{107,132,133}. Les souris *Gata1*^{null} meurent d'anémie au milieu de la gestation entre E10.5 et E11.5, par apoptose des progéniteurs érythroïdes arrêtés dans leur maturation, et ce malgré l'augmentation très importante de l'expression de GATA2 (x 50) ^{132,134}.

GATA1 est aussi critique à la maturation terminale mégacaryocytaire, aux étapes précoces de la différenciation éosinophile et aux étapes tardives de la différenciation mastocytaire ¹²⁵. Les souris ayant une expression de *Gata1* faible (modèle de souris KO ayant une activité promotrice résiduelle d'environ 20% du WT) sont anémiques à la naissance, puis retrouvent une érythropoïèse correcte, alors qu'elles restent thrombopéniques et montrent un défaut de différenciation mastocytaire à l'âge adulte ^{125,130,135}.

L'expression de GATA1 est diminuée dans les lignées myélomonocytaires. Sa surexpression dans une lignée myélomonocytaire aviaire bloque la différenciation myélomonocytaire et conduit à une reprogrammation vers les lignées éosinophile, mégacaryocytaire et érythroblastique ¹³⁶. Une corrélation du niveau d'expression de GATA1 avec la différenciation hématopoïétique a ainsi pu être mise en évidence, les plus hauts niveaux d'expression ayant été retrouvés dans les mégacaryocytes.

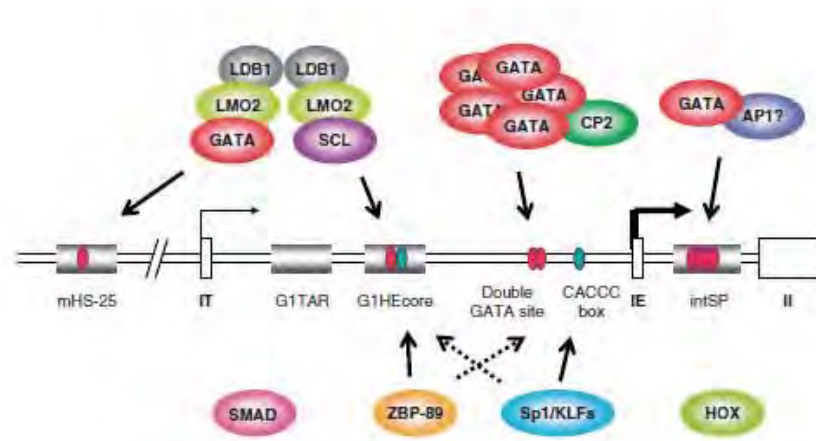


Figure 10. Eléments de régulation en *Cis* et *Trans* contrôlant la transcription de *Gata1* ¹³⁰.

La régulation de l'expression de GATA1 a été étudiée via des essais de gènes rapporteurs et et des modèles murins transgéniques dans des essais de complémentation. Ces analyses ont montré que les éléments fonctionnels de régulation de GATA1 sont localisés en amont du premier exon IE sur une séquence débutant en -3.9-kb de IE, couvrant l'exon IE et le premier intron ^{130,137} ; cette région très conservée entre la souris et l'homme étant connue sous le nom de GIHRD (*Gata1 hematopoietic regulatory domain*). Cette région contient un enhancer hématopoïétique (G1HE), localisé dans la région la plus distale en amont du site de transcription ¹³⁸, ainsi qu'une zone promotrice plus proximale (promoter-proximal enhancer) comprenant 3 régulateurs en *Cis* dont 2 séquences palindromiques GATA ¹³⁹ permettant une boucle positive d'expression (Figure 10).

Fonctions de GATA1

Gènes activés

Doré et al. ont montré que GATA1 pouvoir se lier à de nombreuses cibles communes aux lignées érythroïdes et mégacaryocytaires, avec cependant des sites de liaison différents. L'observation de conséquences fonctionnelles différentes implique l'action de cofacteurs déterminant de l'engagement vers une lignée ou l'autre ¹⁴⁰. Des milliers de sites WGATAR sont dispersés dans le génome, et il est maintenant reconnu, grâce aux expériences d'immunoprécipitation chromatinienne que GATA1 (ainsi que les autres facteurs GATA) ne se lie pas à tous ces sites : GATA1 et GATA2 partagent des sites d'occupation sur le génome, notamment pour la lignée érythroïde, mais se fixent aussi à des sites distincts ¹⁴¹.

Dans les cellules érythroïdes, GATA1 contrôle l'activation et la répression de nombreux gènes en s'associant par son doigt de Zn N-terminal avec de nombreux cofacteurs. Une de ses cibles qui est aussi son principal partenaire protéique est ZFPM1, initialement nommé FOG1 (Friend Of GATA1) (Figure 11). ZFPM1 a un profil d'expression similaire à GATA1 dans les lignées érythroïde et mégacaryocytaire ¹⁴². L'association entre GATA1 et ZFPM1 se fait par liaison du doigt de Zn N-terminal de GATA1 aux 4 doigts de Zn de ZFPM1 ¹⁴³. Même si ZFPM1 ne se lie pas directement à la chromatine, son absence perturbe la fonction de GATA1 ¹⁴⁴. Un mutant GATA1 possédant une capacité de liaison réduite à ZFPM1 empêche la différenciation érythroïde terminale quand il est introduit dans une lignée cellulaire déficiente pour GATA1 (cellules G1E GATA1^{-/-}). La co-expression dans cette même lignée d'un mutant de ZFPM1 contenant une mutation permettant de restaurer sa liaison à GATA1, permet la restauration du phénotype, confirmant le rôle essentiel de l'interaction protéique GATA1-ZFPM1 ¹⁴⁵.

GATA1 est aussi directement impliqué dans la survie des précurseurs érythroïdes par sa fixation sur les promoteurs du récepteur de l'érythropoïétine ¹⁴⁶ et de TAL1, la mutation du site GATA en -37 ayant un effet drastique sur l'expression de TAL1 (diminution importante de l'activité promotrice dans la lignée érythroïde).

Alors que de nombreux gènes cibles de GATA1 dépendent de la liaison entre ZFPM1 et GATA1, d'autres gènes sont régulés par GATA1 sans le besoin d'une association avec ZFPM1 ¹⁴⁷, GATA1 s'associant avec d'autres co-facteurs comme l'histone acétyltransférase EP300 (CBP/p300) ¹⁴⁸, MED1 ¹⁴⁹ ou le remodeleur chromatinien SMARCA4 (BRG1) ¹⁵⁰.

GATA1 est également retrouvé dans un complexe pentamérique composé de GATA1, LMO2, LDB1, SCL et E2A, activant la transcription à partir des promoteurs contenant des E-box et des sites GATA ¹⁵¹.

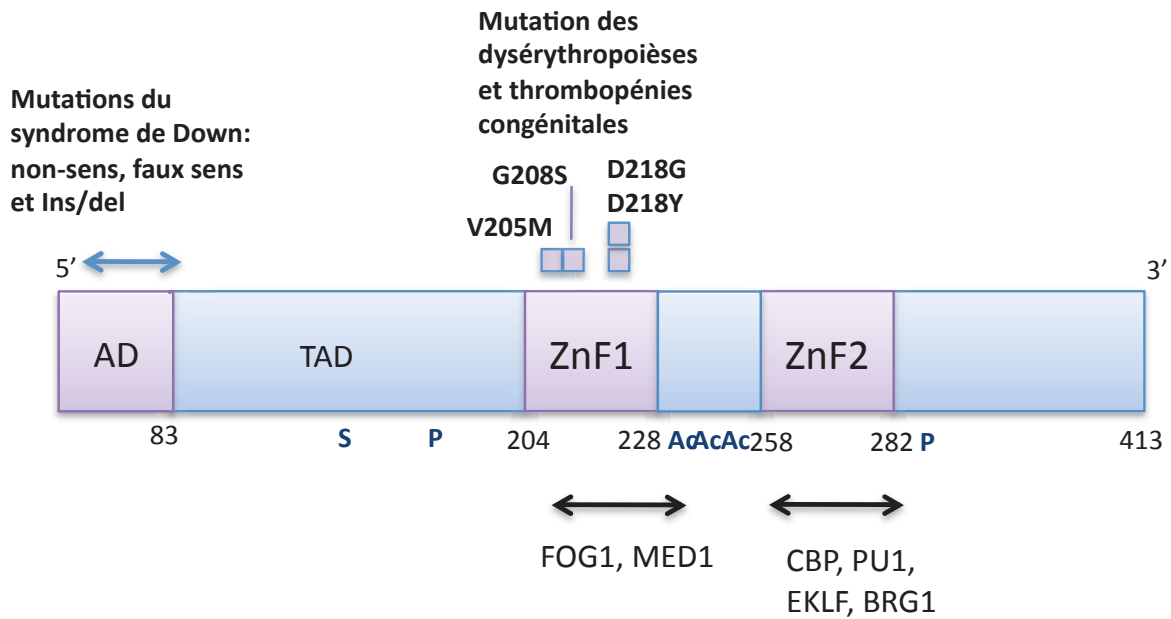


Figure 11. Domaines fonctionnels, interactions et mutations de GATA1. Les modifications post traductionnelles incluent la sumoylation d'une Lys137, l'acétylation des Lys233, Lys245 et Lys246 et la phosphorylation des Ser310 et Ser142, d'après Bresnick et al. ¹⁵². AD=domaine d'activation N-terminal ; ZnF= domaine en doigt de Zinc.

Gènes réprimés

La fixation de GATA1 ne conduit pas nécessairement à une induction de l'expression des gènes cibles. Ainsi, l'expression de GATA2 est réprimée par l'action de GATA1. La présence d'une mutation ponctuelle de GATA1 perturbant l'association entre GATA1 et ZFPM1 empêche la répression de l'expression de GATA2 nécessaire à la différenciation terminale érythroïde malgré la fixation de GATA1 au locus de GATA2. L'absence d'association à ZFPM1 empêche le recrutement par GATA1 des enzymes impliquées dans la désacétylation des histones H3 et H4 et par conséquent la répression de l'expression de GATA ¹⁴⁴. D'autres gènes sont réprimés par GATA1 comme SPI1 (PU-1) ¹⁵³. SPI1 est un facteur essentiel au développement des lignées monocytaires, granulocytaires et lymphoïdes. GATA1 inhibe la fonction de SPI1 en empêchant sa liaison au cofacteur JUN. SPI1 exerce aussi une fonction antagoniste sur GATA1 en se liant par son domaine de transactivation N-terminal au doigt de Zn C-terminal de GATA1, empêchant ainsi l'activité de GATA1 via sa liaison aux séquences consensus (T/A)GATA(A/G) ⁹¹.

Mutations de GATA1

Chez l'Homme, des mutations de GATA1 sont retrouvées dans les LAM de type mégacaryocytaire en présence ou non du syndrome de Down. Les mutations associées au LAM mégacaryocytaires du syndrome de Down incluent des mutations faux-sens, non sens, de courtes ins/del et résident toutes au niveau de l'exon 2 (ou des sites d'épissage de l'intron suivant) ; ces mutations diminuent l'expression de la protéine principale de 50kD. Les mutations de GATA1 sont aussi retrouvées dans des maladies hématologiques congénitales (dysérythropoïèse congénitale et thrombopénie)¹⁵⁴, en particulier au niveau du résidu Val²⁰⁵ essentiel à la liaison entre GATA1 et ZFPM1 (Figure 11).

GATA3

Expression de GATA3

GATA3 est situé en 10p14, possède 6 exons dont 2 premiers exons alternatifs non traduits 1a et 1b. GATA3 est, comme GATA1 et GATA2, bien conservé durant l'évolution chez les vertébrés, l'identité entre la souris et l'homme étant de 97% au niveau protéique.

GATA3 est très fortement exprimé dans le compartiment hématopoïétique, et joue un rôle essentiel dans le développement et la fonction des lymphocytes, surtout T mais également B et les cellules lymphoïdes « *innate-like* » (ILCs : NK, NKT) (pour revue¹⁵⁵). GATA3 est aussi exprimé dans les CSHs, régulant la balance entre leur quiescence et leur différenciation^{156,157}. On retrouve aussi l'expression de GATA3 dans de nombreuses cellules non hématopoïétiques, que ce soit au stade embryonnaire ou adulte, dans les cellules endothéliales vasculaires, les surrénales, les reins, le système nerveux central, l'oreille, les follicules capillaires, la peau et la glande mammaire¹⁵⁸.

La transcription de GATA3 est régulée par de nombreuses voies de signalisation, parmi lesquelles celles de l'IL4/STAT6, WNT/NOTCH, via l'activation du TCR, l'IL2 et la voie PI3K-mTOR¹⁵⁹⁻¹⁶² (Figure 11).

GATA3 possède une boucle d'autorégulation permettant une activation indépendante de la stimulation cytokinique, via une liaison sur un élément en *cis* sur le locus de GATA3¹⁶³.

Fonctions de GATA3

La délétion de *Gata3* chez la souris conduit les embryons *Gata3*^{-/-} à un décès entre E11 et E12 par hémorragie liée à un défaut d'hématopoïèse foétale associé à un retard de croissance, et à des malformations du système nerveux central ¹⁶⁴.

GATA3 intervient dans la régulation de l'immunité acquise mais aussi innée. GATA3 intervient dans la différenciation et le développement des ILCs, parmi elles, les cellules NK. Les cellules NK *Gata3*^{-/-} ont un phénotype immature, sont incapables de migrer vers le foie et produisent moins d'interféron gamma en réponse à une infection par *Listeria monocytogenes* ¹⁶⁵. GATA3 est aussi essentiel pour la génération d'ILCs de classe 2, qui jouent un rôle important au niveau des barrières muqueuses, ainsi qu'au niveau des mécanismes d'inflammation et d'auto-immunité ^{166,167}.

GATA3 a été identifié initialement comme régulateur de la différenciation thymique des progéniteurs T précoces, via la voie de signalisation de NOTCH1 ^{168,169}. Au-delà de son implication dans la différenciation précoce T, GATA3 a été identifié comme un régulateur majeur de la différenciation Th2 des cellules T CD4 ¹⁷⁰ (Figure 12). Ainsi, dans les modèles murins chimériques présentant une délétion conditionnelle de *Gata3* dans la lignée hématopoïétique, la lignée cellulaire T ne peut se développer alors que la lignée B est conservée. D'autres modèles ont été développés ultérieurement permettant de conclure que GATA3 bloque aussi le développement B quand il est exprimé à un niveau élevé ^{168,171}.

GATA3 contrôle les fonctions cellulaires à travers la régulation de l'expression de ses gènes cibles (Figure 11). Par exemple, la différenciation Th2 est directement régulée par la liaison de GATA3 sur les régions promotrices d'*IL5* et d'*IL3*, les régions intra géniques d'*IL4* et le motif CGRE au sein du locus d'*IL3* ¹⁷²; de plus, pour inhiber la différenciation Th1, GATA3 diminue l'expression de STAT4 et d'*IL12RB2*, éléments critiques de cette différenciation ^{173,174}. Le contrôle transcriptionnel est distinct au niveau de chaque type cellulaire T et fait intervenir différents cofacteurs comme ETS, RUNX1, AP1, NFE2L1 (TCF11) et FLI1 qui modifient directement les gènes cibles ou des marqueurs épigénétiques ¹⁷⁵.

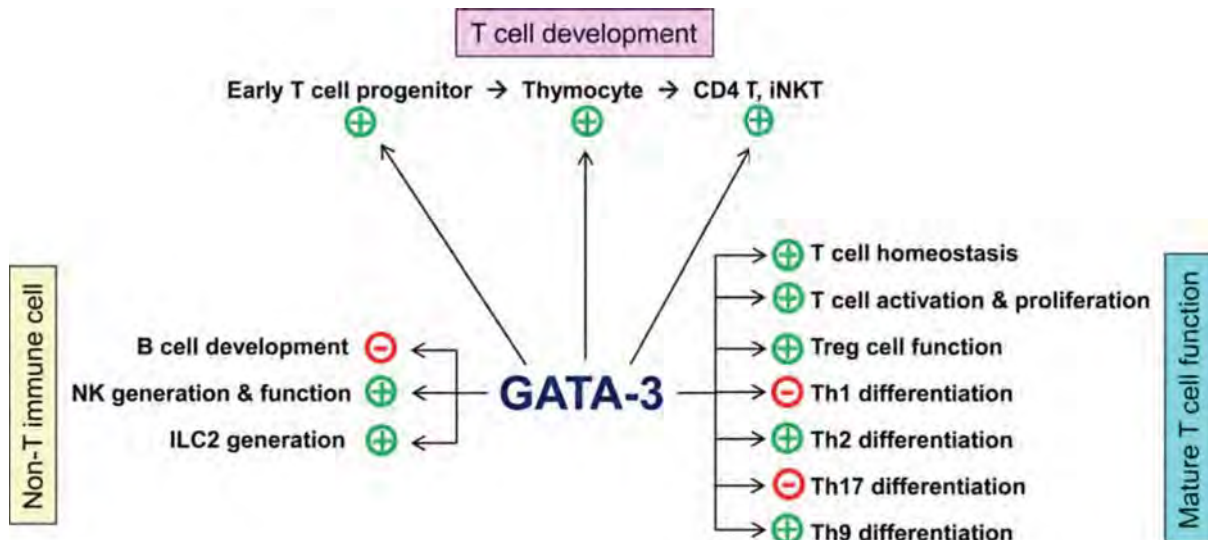


Figure 12. GATA3 contrôle le développement et la fonction des cellules immunitaires, principalement le développement lymphoïde T¹⁵⁵

Mutations de GATA3

Les mutations bi-alléliques de *GATA3* ont récemment été retrouvées dans 10% des leucémies lymphoblastiques de la lignée T touchant un progéniteur précoce (ETP-ALL),¹⁷⁶. Les mutations hétérozygotes décalant le cadre de lecture de *GATA3* sont aussi retrouvées dans certains cancers du sein sporadiques et familiaux et représentent un marqueur de pronostic^{177,178}.

L'haploinsuffisance germinale de *GATA3* est responsable du syndrome de Barakat chez l'homme, associant hypoparathyroïdie, surdité et dysplasie rénale.

Partie 4 - GATA2

Le gène *GATA2* est transcrit à partir de 2 promoteurs sous le contrôle de 5 sites de régulation et de nombreux facteurs de transcription.

Les 2 isoformes protéiques de *GATA2* sont soumis à des modifications post traductionnelles et agissent de concert avec un cœur de 7 co-facteurs pour réguler des gènes de prolifération et de différenciation des CSHs.

GATA2 participe à une boucle d'autocontrôle positif en compétition avec *GATA1* qui réprime progressivement la transcription de *GATA2* permettant la différenciation erythroïde (commutation *GATA* ou *GATA switch*).

GATA2 joue aussi un rôle capital dans la différenciation mégacaryocytaire et mastocytaire, et dans le développement endothélial lymphatique.

Les modèles d'inactivation homozygote et hétérozygote du gène mettent en évidence son rôle crucial dans le renouvellement et la survie des CSHs et des progéniteurs de l'hématopoïèse fœtale et adulte.

Le gène *GATA2* humain est situé en 3q21.3. Il possède un premier exon alternatif non codant (IS et IG) et 5 exons traduits répartis sur environ 14kb. Le gène murin comprend 8.5 kb et est localisé sur le chromosome 6¹⁰⁷.

Transcrits *GATA2*

Le gène *GATA2* humain comprend 13,766 pb, et 3 transcrits de référence ont été décrits chez l'Homme (2 chez la souris) (Figure 13) :

- NM_032638.4 (3383 bp)
- NM_001145662.1 (3263 pb)
- NM_001145662.1 (3484 pb)

La transcription des 2 premiers et principaux transcrits débute au niveau d'exons distincts non codants (IS et IG), alors que les 5 exons restants sont communs aux 2 transcrits. L'expression du premier exon distal IS est restreint à la lignée hématopoïétique et neuronale et est impliqué dans la spécification des CSHs durant l'embryogenèse^{179,180}, tandis que le premier exon proximal (exon IG) est utilisé dans tous les tissus exprimant *GATA2*. Le troisième transcrit débute par un exon additionnel avant IG (sept exons), mais code pour la même isoforme protéique que NM_032638.4.

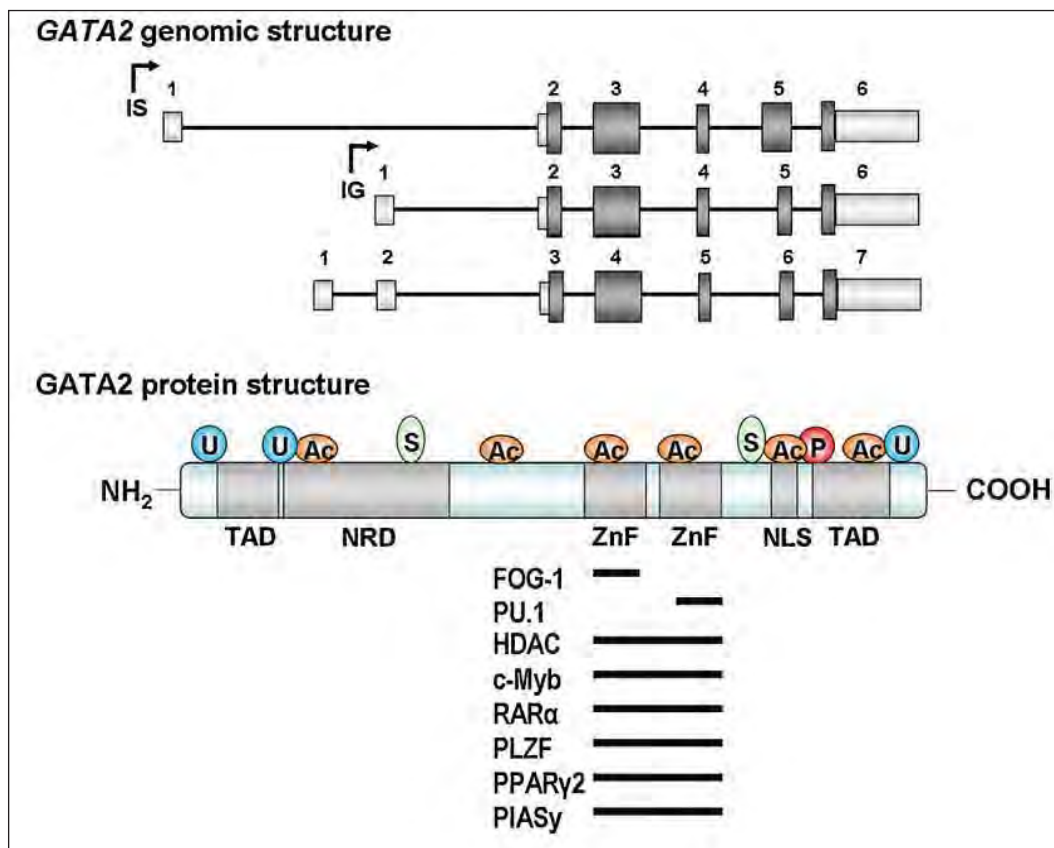


Figure 13. Structure génomique et protéique de GATA2. Les 5 exons traduits sont notés en gris foncé, les régions 3' et 5' non traduites en gris clair. Les flèches indiquent les sites d'initiation de la transcription. La protéine possède 2 domaines de transactivation (TAD), un domaine de régulation négative (NRD) et 2 doigts de Zn (ZnF). Les modifications post traductionnelles ainsi que les interactions protéiques avec les doigts de Zn sont notées : phosphorylation (P), acétylation (Ac) SUMOylation (S) and ubiquitination (U)¹⁸¹.

L'expression de GATA2 est régulée à des niveaux multiples, et ce contrôle est nécessaire à l'obtention de niveaux d'expression variables dans la différenciation hématopoïétique et selon la spécification cellulaire. Nous avons vu que sa transcription se réalise à partir du premier exon distal IS dans les tissus hématopoïétiques et neuronaux. Mineghisi *et al.* en 1999 ont mis en évidence initialement dans un essai de gène rapporteur chez la souris transgénique que certaines régions régulatrices autour de ce premier exon IS (3.1 kb) étaient indispensables à l'expression de *Gata2* dans le tissu para-aortique splanchnopleural et dans la région AGM¹⁷⁹.

La complexité de la régulation transcriptionnelle hématopoïétique de GATA2 est devenue une évidence lors de l'identification de nombreuses régions très conservées et contenant des motifs GATA au sein de ses régions régulatrices ¹⁸²⁻¹⁸⁶.

Le gène *Gata2* chez la souris est régulé en *Cis* au niveau de 5 sites de régulation en -77, -3.9, -2.8, -1.8 et +9.5 kb du site d'initiation de la transcription, tous ces sites présentant un certain degré d'activité « enhancer » permettant aussi une boucle d'autorégulation (Figure 14). En principe, chaque site doit conférer une expression qualitative distincte ou contribuer à maximiser l'effet transcriptionnel, même s'il reste complexe de modéliser ces effets transcriptionnels *in vivo*. La délétion chez la souris des motifs situés en -2.8 kb et -1.8 kb a montré que ces 2 régions ne sont pas essentielles pour initier ou maintenir l'expression de *Gata2* dans les CSHs, mais contribuent à majorer la transcription. Le site en -1.8 kb a une activité unique permettant de réprimer l'expression de *Gata2* dans les érythroblastes matures ^{186,187}. Le site en -77 kb confère une activité enhancer à la fois dans les cellules exprimant GATA1 et GATA2 alors que le site en +9.5 kb confère une activité plus importante dans les cellules exprimant GATA2 ¹⁸³. Ce site de régulation situé en +9.5 kb a fait l'objet d'un intérêt récent dans la mesure où il est le siège de courtes délétions de 28pb chez des malades présentant un déficit immunitaire (syndrome MonoMAC) ^{184,185}. Ce dernier contient une *E box* adjacente à un motif GATA, permettant une régulation positive des gènes pan-endothéliaux et l'expression de *GATA2* dans les cellules endothéliales lymphatiques, cardiaques et vasculaires ¹⁸⁸. Dans un modèle murin de délétion conditionnelle homozygote par recombinaison homologue de cet enhancer, les embryons meurent plus tardivement que chez les souris KO, de syndrome hémorragique associé à un œdème variable, conséquence d'une perte d'intégrité vasculaire ¹⁸⁴. A la différence de l'invalidation du gène, la mise en place de l'hématopoïèse primitive reste conservée au niveau du sac vitellin, mais la délétion en *cis* a un rôle sur la fonction des progéniteurs et des CSHs impliqués dans l'hématopoïèse au foie fœtal. Des travaux additionnels ont permis de montrer que la génération de CSHs adultes (long term-repopulating) à partir de l'endothélium hémogénique au sein de la région AGM de l'embryon était perturbée dans un modèle *ex-vivo* de délétion de cet enhancer situé en +9.5kb ¹⁸⁹. Cet élément de régulation gouverne certains gènes de l'endothélium hémogénique (*Lyl1*, *Spi1*, *Ikzf1*), d'autres impliqués dans l'hématopoïèse comme *Tal1* et certains gènes dans les 2 types cellulaires (*Gata2*, *Myb*, *Mpl*, *Cdk6*, *Runx1*...).

Les différents sites de régulation de GATA2 exercent des propriétés fonctionnelles *in vivo* spécifiques, un modèle murin récent d'ablation du site en -77 kb a permis de montrer que ce site était important pour les capacités de multipotentialité des cellules progénitrices myéloïdes, mais pas pour la génération des CSHs, à la différence du modèle d'inactivation du gène ou du modèle de délétion de l'élément en +9,5kb (+9.5^{-/-} 190).

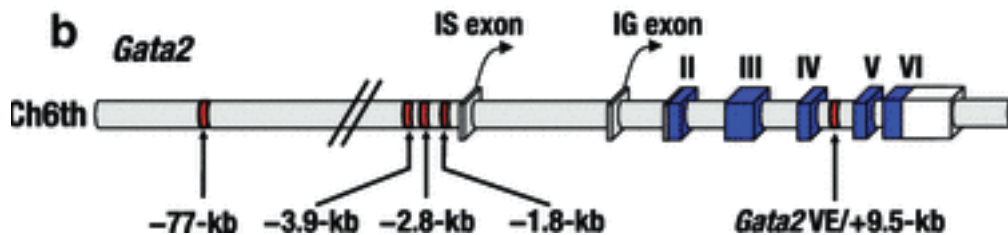


Figure 14. Zones régulatrices du gène *Gata2* murin. Les 5 exons codants sont représentés en bleu, le premier exon alternatif IS est spécifique des cellules hématopoïétiques et neuronales, alors que l'exon IG est présent dans toutes les cellules exprimant GATA2. Les zones régulatrices sont représentées en rouge¹⁹¹

L'expression de GATA2 est régulée par de nombreux facteurs de transcription comme CEBPA, HOXA9, ETS1¹⁹², BMP4¹⁹³, NOTCH1¹⁹⁴, SPI1/PU1¹⁹⁵ et MECOM (EVI1)¹⁹⁶ et par les cytokines IL1 et TNF α ^{181,197}. BRG1 (Brahma related gene 1), un « remodeleur » chromatinien, agit aussi avec LDB1 (LIM domain binding 1) pour établir et maintenir l'expression de GATA2 en maintenant le site en +9.5 Kb dans une configuration chromatinienne accessible¹⁹⁸.

Le proto-oncogène MECOM régule lui aussi la prolifération des CSHs via GATA2. Les souris *Mecom*^{-/-} meurent à E10.5 et montrent un défaut dans l'auto-renouvellement et les capacités de repopulation des CSHs. L'expression de *Gata2* est profondément diminuée chez ces souris et la restauration de l'expression soit de *Mecom*, soit de *Gata2* dans ces cellules permet la restauration des capacités de prolifération et d'autorenouvellement des CSHs *in vitro*. *Mecom* se lie directement sur le promoteur de *Gata2*, et son acétylation sur une Lysine 564 majore cette activité transcriptionnelle^{196,199}.

Parmi les éléments de régulation épigénétique, l'histone-lysine méthyltransferase Kmt5a (Setd8) réprime l'expression de *Gata2* en se liant sur ses éléments de régulation en *cis* et semble ainsi participer à la maturation érythroïde²⁰⁰. Les histones HDAC3 et HDAC5, mais pas HDAC1 se lient à GATA2 et suppriment ses possibilités de transactivation *in vitro* dans les cellules HEK293T²⁰¹. Dans un modèle de zebrafish, GATA2 peut aussi être régulé par un microARN, miR-451²⁰². Ahn *et al.* ont montré plus récemment que SON (intervenant dans

l'épissage des ARN) peut réguler le niveau d'expression protéique de GATA2 via la liaison en 3'UTR de miR27a²⁰³.

Protéines GATA2

Les ARN messagers de GATA2 codent pour deux protéines ayant le même site d'initiation de la traduction, localisé sur l'exon 2, mais ont une extrémité C-terminale différente (par épissage alternatif du dernier exon) :

- L'isoforme 1 (480 acides aminés, 50.5 kDa) ;
- L'isoforme 2, plus court (466 acides aminés, 49.1 kDa), qui est tronqué de 14 résidus au niveau du deuxième doigt de zinc lié à un épissage alternatif au niveau du dernier exon.

Les protéines contiennent 2 doigts de Zn de type Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys permettant la liaison à l'ADN et aux co-facteurs protéiques. Les doigts de Zn C- et N-terminaux sont codés par les exons 4 et 5 respectivement. Les conséquences fonctionnelles de l'absence d'une partie du doigt de Zn C-terminal sur l'isoforme 2 ne sont pas connues à ce jour. Le doigt proximal (doigt de Zn1, acides aminés 295 à 319) participe à l'interaction protéique tandis que le doigt distal (doigt de Zn2, acides aminés 349 à 373) permet la liaison à l'ADN.

Le rôle de GATA2 dans la régulation de l'hématopoïèse précoce est très lié à ces 2 doigts de Zn très conservés en C- et N-terminal, et à leurs régions adjacentes, incluant 2 domaines de transactivation (TAD), un signal de localisation nucléaire (NLS) et un élément de régulation négative (NRD, acides aminés 74-235). Les autres éléments de la protéine GATA2 incluent des éléments de modifications intervenant dans la stabilité de la protéine dans les cellules hématopoïétiques^{204,205}.

Les modifications post-traductionnelles incluent phosphorylation²⁰⁶, acétylation²⁰⁷, sumoylation²⁰⁸ et ubiquitination²⁰⁹, et sont importantes pour la régulation de l'hématopoïèse normale et pathologique (Figure 13). Par exemple, l'interleukine 3 conduit à une phosphorylation de GATA2 via les MAP kinases²⁰⁶. Une autre phosphorylation peut intervenir sur la serine en position 401, empêchant la liaison de GATA2 avec ses cibles sur l'ADN²¹⁰. Une régulation de GATA2 semble avoir lieu via la phosphorylation de GATA2 par un complexe CDK/Cyclines, suggérant une expression de GATA2 dépendante de la régulation du cycle cellulaire²¹¹.

GATA2 peut être soumis à acétylation en K102 dans la région N-terminale, et de nombreuses autres lysines dans le domaine en doigt de Zn peuvent être acétylées, incluant K281, 285, 334, 336, 389,390, 399, 403, 405, 406, 408 and 409. Ces sites d'acétylation sous le contrôle de EP300 permettent de majorer la liaison de GATA2 à l'ADN et les capacités de transactivation du gène ²⁰⁷. La mutation de ces sites d'acétylation engendre une perte importante des capacités de transactivation de GATA2.

La protéine GATA2 est rapidement détruite par ubiquitinylation, 3 sites d'ubiquitinylation ont été décrits dans des régions situées en dehors des doigts de Zn (acides aminés 1-70, 153-256, et 412-480) ^{207,209}. GATA1 et GATA2 sont détruits par le protéasome, cependant GATA2 est bien moins stable que GATA1 (demi-vie d'une heure contre plus de 4h pour GATA1), ce qui est un déterminant majeur du processus de *switch GATA* ²¹².

Complexes protéiques de GATA2

Malgré plus de 7 millions de motifs GATA dans le génome humain, tous pouvant *in vitro* être théoriquement le site de liaison de facteurs GATA, GATA1 et GATA2 occupent seulement 0.1 à 1% de ces motifs dans les érythroblastes, basé sur l'observation des résultats d'immunoprécipitation chromatinienne dans une lignée cellulaire érythroïde K562, associé à une validation par séquençage, et renforcé par de nombreuses autres observations antérieures ^{141,182,183,213}.

Les déterminants moléculaires de cette discrimination *in vivo* peuvent être l'existence d'éléments de régulation en *cis*, de nucléotides flanquant les motifs WGATAR ou d'une régulation épigénétique. Par exemple, Wosniak *et al.* ont montré, dans la lignée cellulaire murine G1E, que Gata2 colocalisait avec Tal1 et avec les histones déméthylées H3K4 et H3K36 sur des sites chromatinien contenant une E-box proche d'un site WGATAR ²¹⁴.

Les modalités d'interaction protéiques varient aussi en fonction des protéines partenaires : GATA2 interagit avec ZFPM1 avec le doigt de Zn N-terminal ¹⁵³, avec SPI1 et CEBPA avec celui en C-terminal ou ses régions adjacentes ^{205,215}, et a besoin des 2 doigts de Zn pour interagir avec HDAC ²⁰¹, MYB ²¹⁶, RARA ²¹⁷, PLZF ²¹⁸, PPARG ²¹⁹, et PIAS4 ²⁰⁸.

Au stade de CSHs et progéniteurs, GATA2 peut réguler *SPI1*, facteur de la famille ETS essentiel pour le développement myéloïde, en se liant sur des régions conservées. GATA2 maintient la cellule hématopoïétique à un stade immature, en activant modérément l'expression de PU.1, maintenant un niveau faible d'expression des gènes de la lignée

myéloïde en aval. Ce dernier exerce une boucle d'autorégulation négative sur GATA2 en retour permettant le maintien du statut cellulaire immature ²²⁰.

GATA2 agit *in vitro* dans une lignée de progéniteurs hématopoïétiques murins HPC-7, de concert au sein d'un cœur de 7 co-facteurs : TAL1, LMO2, LYL1, ERG, FLI1 et RUNX1, pour former une unité régulatrice contrôlant plus de 1000 loci au niveau des CSHs et cellules progénitrices ⁷ (Figure 15 et 16). LDB1 (protéine co-facteur transcriptionnel) peut s'associer à certains de ces co-facteurs (LMO2, GATA2) sur des gènes cibles critiques pour la génération de CSHs de l'hématopoïèse fœtale et adulte, témoignant de son rôle important dans ce complexe protéique transcriptionnel ²²¹.

TAL1 joue un rôle majeur dans la spécification cellulaire, les souris *Tal1*^{-/-} meurent à E9.5 ^{222,223}. TAL1 est nécessaire à la génération des CSHs et à leur multipotence, mais pas pour leur survie. GATA2 semble réguler la prolifération et la différenciation des CSHs via l'activation de son partenaire TAL1 après fixation sur son promoteur ²²⁴, ainsi que via l'implication de la voie de signalisation embryonnaire acide retinoïque-BMP-GATA2 qui contrôle la survie des progéniteurs hématopoïétiques dans les étapes précoces de l'hématopoïèse ²²⁵. Pimanda *et al.* en 2007 ont souligné le rôle commun de Fli1, Tal1 et Gata2 agissant de concert pour réguler la spécification des CSHs ²²⁶. Dans les CSHs, ces 3 facteurs agissent chacun en activant l'expression des 2 autres, créant ainsi un réseau commun et fort. Le développement des CSHs depuis l'endothélium hémogénique est aussi dépendant de l'activation de la voie Notch1, et est altéré dans les embryons déficients en *Notch1* ¹⁹⁴. *Notch1* et *Gata2* sont co-exprimés dans les cellules du plancher de l'endothélium vasculaire de l'AGM à un stade précoce (E10.5), Notch1 activant la transcription de *Gata2* et son expression dans la mise en place de l'hématopoïèse définitive chez l'embryon ^{194,227}. De plus, Bmp4 est aussi exprimé sur la partie ventrale de l'aorte dorsale à un stade plus tardif (E11.5) ²²⁸ et peut réguler directement l'expression de *Gata2* ^{193,229}, comme être aussi directement augmenté par Gata2 lui-même ²³⁰ (Figure 15). Sous l'influence initiale de Notch1 et/ou Bmp4, est initiée une voie de signalisation dans les CSHs et les progéniteurs permettant de maintenir l'expression de Gata2, Fli1 et Tal1 dans ces cellules. Ces derniers sont recrutés directement au niveau d'un enhancer du gène *Runx1*, gouvernant la prolifération des CSHs ²³¹. Enfin, Gata2, en collaboration avec Smad5, gouverne l'expression d'Eklf, important dans la spécification des progéniteurs hématopoïétiques ²³².

Gonade Mésonéphros), en clusters de cellules souches réparties au niveau de la partie ventrale de l'aorte dorsale et le long des principales artères ^{5,6}.

Durant l'embryogenèse, *Gata2* est exprimé dès E7.5 dans les cellules endothéliales des deux aortes dorsales. Ensuite, *Gata2* est exprimé dans les cellules endothéliales hémogéniques de la paroi de l'aorte dorsale, des artères vitellines et ombilicales et dans des clusters cellulaires intra-artériels, préfigurant la génération des CSHs au niveau du sac vitellin, du foie fœtal, du placenta et enfin de la moelle osseuse adulte (Ng, 1994, Orlic, 1995, Minegishi, 1999, Nardelli, 1999, Robert-moreno, 2005).

GATA2 est exprimé dans (Figure 15) :

- les cellules hématopoïétiques : cellules souches hématopoïétiques (CSH), progéniteurs multipotents communs myéloïdes (CMP), progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytes, polynucléaires éosinophiles et mastocytes. L'expression de GATA2 est faible dans les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP), ainsi que dans les progéniteurs communs granulo-macrophagiques (GMP), et absente dans les cellules dendritiques matures ^{5,179,236-239}.
- les cellules endothéliales ^{184,185,188,240-243}.
- le système nerveux central ^{244,245}.
- les cellules embryonnaires cérébrales et hépatiques ²⁴⁶.
- les cellules placentaires ²⁴⁷.
- les précurseurs adipocytaires ²¹⁹.
- les cellules souches mésenchymateuses ^{248,249}

GATA2 est exprimé dans de nombreux autres types cellulaires mais à un niveau d'expression faible ¹⁰⁹. Les lignées cellulaires dans lesquelles GATA2 possède une expression prépondérante sont détaillées ci-dessous.

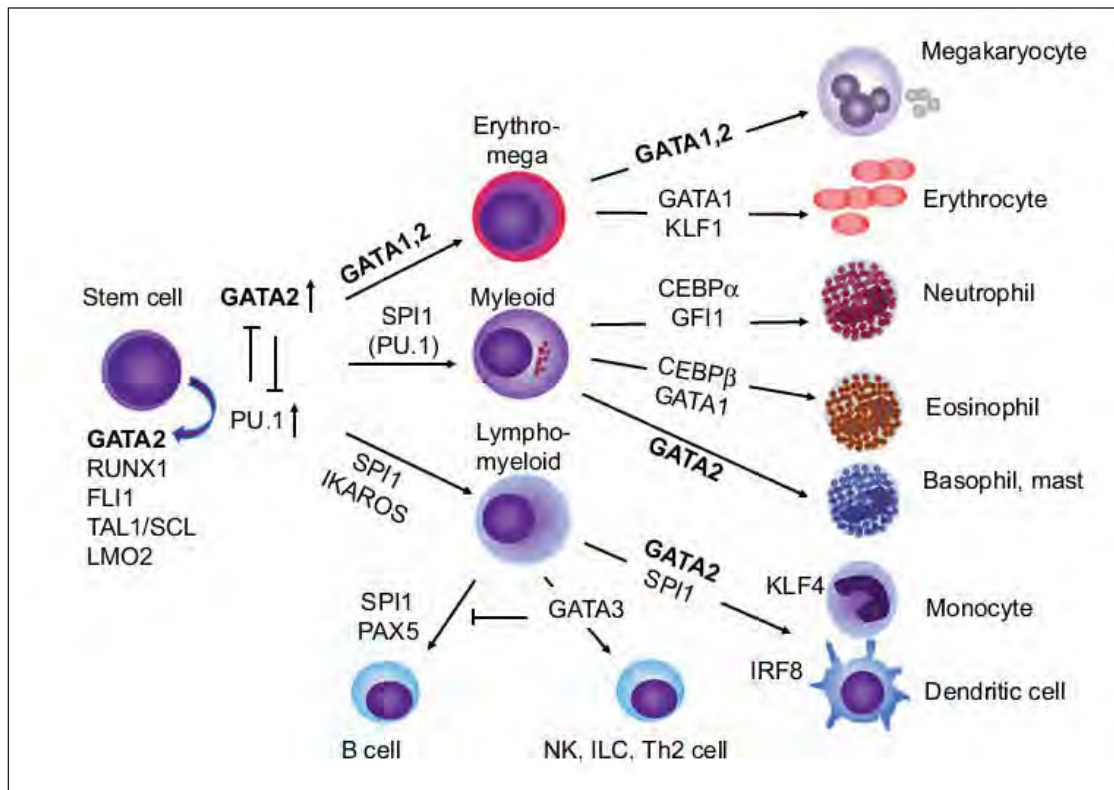


Figure 16. Rôle de GATA2 dans la différenciation hématopoïétique. Schéma simplifié des interactions de GATA2 avec les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des différentes lignées. La liste des facteurs de transcription n'est pas exhaustive. Dans le GATA switch, GATA2 est remplacé par GATA1 lors de la différenciation érythrocytaire ¹.

Cellules souches hématopoïétiques et progénitrices

Chez le xénope et le zébrafish, GATA2 est exprimé dans des régions embryonnaires ventrales de l'embryon impliquées dans l'hématopoïèse initiale donnant naissance aux progéniteurs hématopoïétiques ²⁵⁰.

Chez l'Homme, GATA2 est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et dans les cellules progénitrices à un haut niveau d'expression et son expression est diminuée lors de la différenciation cellulaire. Cette étape est nécessaire pour la différenciation terminale hématopoïétique, notamment des cellules érythroïdes ²⁵¹.

Les cellules souches embryonnaires et les corps embryonnaires *Gata2*^{-/-} ont une capacité limitée d'auto-renouvellement et de prolifération, confirmant le rôle clef de GATA2 dans la prolifération et la survie des CSH et progéniteurs ²³⁹. Les études *in vivo* ont permis de mieux définir le rôle clef de GATA2 dans la régulation des cellules souches et progénitrices.

Lignée érythrocytaire – Commutation GATA ou GATA switch (Figure 17)

En sus de son rôle dans la maintenance et le renouvellement des CSHs et progéniteurs, *GATA2* est aussi exprimé dans les érythroblastes et son expression diminue progressivement au cours de la différenciation érythrocytaire.

Les expressions de *GATA2* et de *GATA1* sont séquentielles durant les phases précoces et tardives de la différenciation hématopoïétique : ces deux facteurs de transcription se fixent avec une grande sélectivité par leurs doigts de Zn aux mêmes régions cibles d'ADN avec des propriétés antagonistes dans les études cellulaires^{141,182,183}. Lors des phases précoces de l'hématopoïèse, *GATA2* participe lui-même à une boucle d'auto-contrôle positive en activant sa propre transcription par sa fixation sur des sites transcriptionnellement actifs¹⁸². *GATA2* se fixe aussi sur les régions régulatrices de *GATA1* permettant l'expression de la protéine.

Durant la maturation érythroïde, *GATA2* est rapidement réprimé au profit de *GATA1*, processus communément appelé *commutation GATA* ou *GATA switch* et mis en évidence formellement *in vitro* en 2003 à partir d'une lignée cellulaire d'érythroleucémie GE1^{152,182}. Au fur et à mesure de la différenciation érythroïde murine, *Gata1* supprime la transcription de *Gata2* et déplace *Gata2* au niveau des sites de régulation de *Gata1*^{152,182,183}. Ainsi, dans les progéniteurs érythroïdes, *Gata2* se lie au locus de la bêta-globine et active le gène à un niveau d'expression faible. Quand les proérythroblastes entrent dans leur différenciation terminale, *Gata1* déplace *Gata2* de son locus et induit une augmentation massive de l'expression des gènes des globines. *Gata1* lui-même réprime des gènes essentiels au stade de progéniteurs dont *Gata2*, mais également *Kit*, *Myb* et *Myc*^{182,252,253}.

Dans la lignée érythroïde, *GATA2* coopère aussi avec le facteur de transcription ZFPM1, qui a été initialement décrit comme un partenaire de *GATA1*¹⁴². Dans ces cellules, ZFPM1 et *GATA2* précèdent la *commutation GATA* et favorisent l'occupation de *GATA1* aux mêmes sites. Lorsque ZFPM1 est absent, l'expression de *GATA2* n'est pas diminuée efficacement²¹³. Dans cette même lignée érythroïde, *GATA2* régule aussi négativement la voie TGFβ d'une manière dépendante de SMAD4, en interagissant avec SMAD4 dans sa partie N-terminale. La surexpression de *GATA2* dans les cellules de la lignée K562 induit ainsi un blocage de la différenciation érythrocytaire par un effet TGFβ dépendant, alors que l'inactivation de *Gata2* induit une différenciation érythrocytaire dépendante de cette voie de signalisation²⁵⁴. Des sites de liaison pour *GATA2* ont été identifiés en amont du promoteur du gène *CBFA2T3* (codant pour ETO2) dans la lignée cellulaire d'érythroleucémie K562¹⁴¹. *CBFA2T3* est un

corépresseur agissant de concert avec un complexe protéique incluant TAL1²⁵⁵. Dans les lignées d'érythroleucémie K562 et progénitrice érythroïde G1E, GATA2 se lie et active *CBFA2T3*. Au fur et à mesure de la différenciation, *CBFA2T3* se lie à son propre promoteur et le réprime. Suite à la diminution de l'expression des gènes cibles de *CBFA2T3* : *Hbb*, *Eraf*, *Slc4a1* se déroule la *commutation GATA*. Très récemment, certains acteurs protéiques de la voie Wnt semblent être impliqués en tant que cibles de GATA2 dans la régulation de l'érythropoïèse primitive²⁵⁶.

Les premières observations *in vitro* ont montré que si l'expression de GATA2 est forcée lors du développement érythrocytaire, la différenciation érythroïde est stoppée²⁵⁷. Dans les cellules ES *Gata1*^{-/-}, *Gata2* est surexprimé et l'érythropoïèse terminale est bloquée, mettant en lumière la forte relation entre ces 2 facteurs¹²⁶. En l'absence de *Gata2*, la différenciation érythroïde peut encore avoir lieu²³⁹.

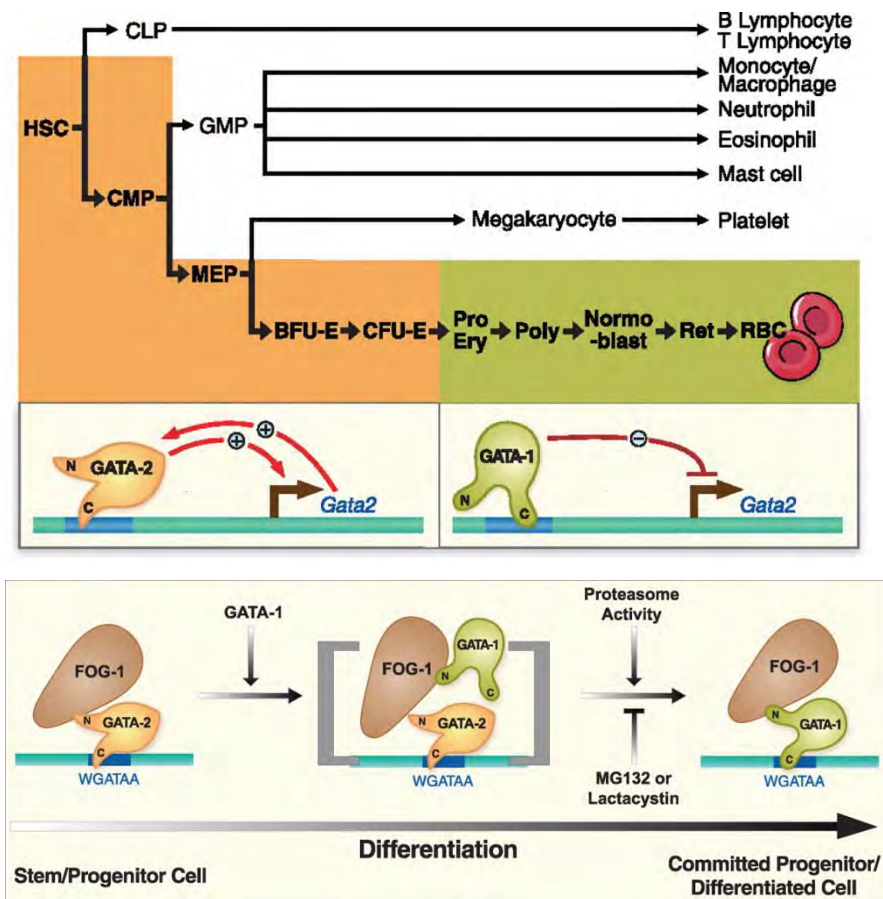


Figure 17. Illustration de la commutation GATA ou du « GATA switch » : GATA1 déplace directement GATA2 de son locus et réprime sa transcription durant l'hématopoïèse. ZFPM1 (FOG1) facilite le switch GATA en favorisant l'accessibilité chromatinienne de GATA1. CLP, progéniteurs lymphoïde commun, CMP, progéniteurs myéloïde commun, GMP, progéniteurs granulo-monocytaire commun, MEP, progéniteurs erythro-megacaryocytaire, BFU-E, burst forming unit, CFU-E colony forming unit, Ret, reticulocyte, RBC= red blood cell¹⁵².

Lignée mégacaryocytaire

GATA2 est exprimé à des niveaux d'expression élevés durant la différenciation mégacaryocytaire ²⁵⁸, et, à la différence de la lignée érythroïde, semble indispensable à la différenciation terminale de cette lignée. La surexpression de *GATA2* dans des lignées cellulaires myéloïdes telles que 416B induit une différenciation mégacaryocytaire ²⁵⁹.

Huang *et al.* ont démontré récemment sur le plan fonctionnel et moléculaire l'implication de *GATA2* dans la mégacaryopoïèse, en l'absence de *GATA1*, en activant la prolifération des progéniteurs cellulaires *in vitro* (CFU-MK), l'expression de gènes des lignées mégacaryocytaire et érythroïde comme *Tubb1*, *Gp1bb*, *Klf1*, tout en diminuant l'expression des gènes myéloïdes comme *Cebpa*, *Mpo* et *Sfpi1* (genome wide microarray dans la lignée cellulaire G1ME) ²⁶⁰. De façon intéressante, les auteurs ont identifié 4 nouvelles cibles de *GATA2* dans la lignée mégacaryocytaire, incluant *Hhex*, *Slamf1*, *Sfpi1* et *Lmo2*.

Dans la lignée mégacaryocytaire G1ME, *Gata2* et *Zfpm1* régulent le promoteur de *Spi1* réprimant son expression ²⁶¹. *Gata1* ensuite réprime davantage l'expression de *Spi1*. Cette répression par les facteurs *Gata* est essentielle à la maintenance du phénotype mégacaryocytaire des cellules progénitrices ²⁶². En plus de *Spi1*, *Gata2* régule directement d'autres facteurs de transcription cibles comme *Mpo*, *Cebpa*, *Hhex*, ainsi que certains régulateurs du cycle cellulaire *E2f2*, *Skp2*, *Cdkn1a* (*p21*) et *Cdkn1b* (*p27*) ²⁶⁰. *Gata2* coopère aussi avec *Ets1* au niveau de nombreux sites cibles de régulation de la transcription au sein de la lignée mégacaryocytaire G1ME ¹⁴⁰.

Cellules mastocytaires

Les cellules *Gata2*^{-/-} du sac vitellin maintenues en culture avec de l'interleukine 3 (IL3) et du Stem Cell Factor (SCF) ne permettent pas de générer de cellules mastocytaires ²³⁹, soulignant le rôle important de *Gata2* dans la différenciation mastocytaire.

De façon analogue à la *commutation GATA* dans la lignée érythroïde, un switch a été décrit plus récemment dans les cellules mastocytaires semblant impliquer *Zfpm1* ²⁶³. L'expression de *Zfpm1* dans les précurseurs mastocytaires arrête leur maturation, indiquant sa répression nécessaire dans les étapes de différenciation mastocytaire. De plus, dans les cellules mastocytaires, *GATA2* occupe un élément de régulation de *Zfpm1*, alors que *GATA1* semble peu occuper ce locus de régulation en *cis*, à l'opposé de ce qui est observé pour la lignée

érythroïde. GATA2 ayant un rôle important dans la différenciation mastocytaire, et ZFPM1 pouvant potentiellement antagoniser le rôle de GATA2 en se liant sur ses séquences régulatrices au locus situé en -2.8kb, Cantor *et al.* proposent un modèle de cross régulation entre GATA2 et ZFPM1 lors du switch. Une expression importante de GATA2 durant le développement mastocytaire pourrait diminuer l'expression de ZFPM1, pouvant majorer l'expression de GATA2 et ainsi diminuer encore l'expression de ZFPM1. A l'inverse, une expression importante de ZFPM1 dans les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires inhibe l'expression de GATA2 par la même boucle et permet la reprogrammation des précurseurs mastocytaires en cellules érythroïdes, mégacaryocytaires et granulocytaires²⁶³.

Plus récemment, le rôle de GATA2 a aussi été mis en évidence dans des précurseurs mastocytaires *in vitro*. La délétion du domaine en doigt de Zn dans les précurseurs médullaires mastocytaires murins entraîne la perte du phénotype mastocytaire, une dédifférenciation en cellules myéloïdes CD11b+ et/ou Ly6C/G positives. La majoration de l'expression de CEBPA dans ce contexte semble jouer un rôle dans la dédifférenciation cellulaire²⁶⁴.

Dans les cellules mastocytaires, Ohmori *et al.* proposent un mécanisme de régulation complexe, cellulaire et temps dépendant, dans lequel GATA2 permettrait de maintenir une étape de développement précoce des cellules mastocytaires et des basophiles en réprimant CEBPA par sa liaison directe sur les régions promotrices en +37kb, et ainsi inhiber la liaison de RUNX1 et SPI1 sur les régions voisines²⁶⁴. Dans les cellules mastocytaires, GATA2 coopère avec SPI1, même si ce dernier peut aussi inhiber l'expression de GATA2 dans d'autres modèles cellulaires¹⁹⁵.

Cellules endothéliales

L'implication de GATA2 dans le développement des cellules endothéliales a été initialement identifiée lors de l'activation de l'expression de l'endothéline-1 dans les cellules endothéliales²⁶⁵. Tsai et al, dans leur modèle murin d'inactivation du gène conduisant à une létalité précoce par défaut d'hématopoïèse, ont cependant observé un développement vasculaire morphologiquement normal⁵. Il est probable que cette létalité précoce associée à la redondance des facteurs GATA dans l'endothélium pendant l'embryogenèse précoce ne permette pas de déceler ces effets vasculaires précoces.

Plus récemment, de nombreuses évidences suggèrent le rôle de GATA2 dans l'endothélium. L'ablation de *gata2a* chez le zébrafish affecte la morphogenèse de l'aorte dorsale, témoignant d'un rôle précoce dans la morphogenèse vasculaire ²⁶⁶.

GATA2 est exprimé dans les cellules endothéliales adultes où il joue un rôle important dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes contenant des motifs GATA dans leurs régions promotrices : *NOS3 (eNOS)*, *VWF (von Willebrand factor)*, *KDR*, *PECAM1*, *VCAM1* et *ANGPT2* ²⁶⁷⁻²⁷³. La voie de signalisation BMP/SMAD est un élément majeur de régulation de l'angiogenèse chez l'embryon. GATA2 et FLI1 régulent l'expression de SMAD1 et SMAD5 dans les cellules endothéliales *in vitro* via leur fixation sur les motifs GATA ²⁷⁴.

L'analyse de type ChipSeq sur des cellules microvasculaires endothéliales humaines (HMVEC) a permis de montrer que GATA2 régulaient un ensemble de gènes spécifiques dans une lignée de cellules endothéliales humaines, incluant *EMCN (endomucine)*, *SNAI1 (Snail)*, *SNAI2 (Slug)*, *HMG2* et *TGFB2* ²⁷⁵. Dans un autre modèle cellulaire de type HUVEC (cellules endothéliales de veine ombilicale humaine), GATA2, entre autres, agit de concert avec AP1, qui joue un rôle majeur dans l'inflammation ²⁷⁶.

Sur le plan fonctionnel, Khandekar *et al.* ont montré qu'un enhancer spécifique situé dans l'intron 4 (en +9.5kb) permettait de réguler l'expression de GATA2 dans les cellules endothéliales vasculaires, cardiaques et lymphatiques ¹⁸⁸. La même équipe avec un autre groupe de recherche ont montré que la délétion du gène ou de cet enhancer chez la souris spécifiquement dans les compartiments hématopoïétiques et endothéliaux, se traduit par une létalité des embryons autour de E16.5 d'hémorragie extensive avec œdème, témoins d'un défaut dans le développement vasculaire lymphatique et s'accompagnant d'un défaut d'hématopoïèse primitive ^{184,185}.

Récemment, différents modèles de délétion conditionnelle spécifique du tissu lymphatique a permis de montrer que *Gata2* jouait un rôle crucial dans le développement vasculaire lymphatique, en permettant la formation et la maintenance des valves des lymphoveines et des vaisseaux lymphatiques, via sa fixation sur les régions promotrices de gènes essentiels dans cette maturation lymphatique comme *PROX1*, *FOXC2* et *NFATC1* ²⁴¹.

Le rôle précis de GATA2 dans les cellules endothéliales artérielles n'est pas élucidé à ce jour. Dans les cellules endothéliales et les hémangioblastes, *Gata2* agit au sein d'un complexe multiprotéique avec Fli1 et Elf1 pour activer l'expression de *Tal1* ²⁷⁷.

Cellules placentaires

GATA2 et GATA3 sont exprimés dans le trophoblaste et régulent l'expression des hormones placentaires ²⁷⁸. Ces 2 facteurs participent à la différenciation des cellules géantes du placenta ²⁴⁷. Un switch est là aussi observé, Gata3 occupant 2 régions régulatrices au locus *Gata2* en -3.8 et +9.5kb, maintenant une répression de sa transcription, et au fur et à mesure de la différenciation cellulaire, Gata2 déplace Gata3 permettant l'activation transcriptionnelle de *Gata2* ²⁷⁸. L'expression de GATA2 est aussi retrouvée dans l'allantoïde sans qu'il soit possible d'en prédire précisément les conséquences fonctionnelles ²⁷⁹.

Fonction biologique in vivo (modèles murins)

L'étude de l'invalidation homozygote de *Gata2* a permis de mettre en évidence son rôle indispensable dans le renouvellement et la survie des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs hématopoïétiques. Le remplacement de la partie génomique correspondant au doigt de Zn C-terminal par une cassette de résistance à la néomycine (*Gata2*^{-/-}) conduit à la mort de l'embryon entre E9.5 et E11.5. Le décès résulte de l'absence d'hématopoïèse primitive au niveau du sac vitellin. Ces embryons *Gata2*^{-/-} ont des vaisseaux du sac vitellin très pâles et pratiquement vides. L'observation de ces embryons à E9.5 montre une réduction de cellules sanguines circulantes par défaut d'hématopoïèse primitive, les autres organes ne semblent pas affectés, y compris dans les tissus d'origine mésodermique. Les souris hétérozygotes *Gata2*^{+/-} sont viables et ne présentent pas de phénotype clinique notable sur les analyses sanguines de routine mais des défauts au niveau des CSHs ^{5,239}.

Lorsque les cellules ES *Gata2*^{-/-} sont introduites dans des blastocystes *Gata2*^{+/+}, les souris chimériques montrent un défaut de contribution des cellules *Gata2*^{-/-} de tous les compartiments hématopoïétiques indispensables à une hématopoïèse adulte (moelle osseuse, rate, thymus et cellules sanguines). Enfin, les cellules souches hématopoïétiques *Gata2*^{-/-} issues de ces animaux présentent des défauts d'auto-renouvellement et de prolifération ne permettant pas la génération de colonies myéloïdes *in vitro* à partir de la moelle ou de la rate de ces animaux ⁵.

Le compartiment lymphoïde est exploré de façon optimale par la génération de chimères générées par complémentarité de blastocystes *Rag2*^{-/-} par les cellules ES *Gata2*^{-/-}. Ces chimères montrent une réduction de la lymphopoïèse thymique, splénique et circulante.

Le rôle de GATA2 dans la différenciation monocyttaire et notamment des cellules dendritiques (CDs) a été étudié récemment dans des modèles murins d'inactivation du gène : la génération de cellules dendritiques myéloïdes à partir de CSHs, de cellules progénitrices ou de progéniteurs communs myéloïdes (CMP) est altérée, celle à partir de progéniteurs granulo-monocytaires communs (GMP) est souvent altérée aussi, mais pas celle liée aux progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), témoignant du rôle préférentiel de GATA2 dans la différenciation myéloïde à l'origine des cellules dendritiques myéloïdes ²³⁶.

L'étude précise de la fonction de GATA2 au niveau des cellules souches et progénitrices a été apportée par l'étude des embryons *Gata2*^{+/-}. Ces embryons montrent un défaut dans la génération, le renouvellement et l'expansion des cellules souches au niveau de leur site embryonnaire primitif de génération des HSCs, la région AGM (*Aorto-Gonado-Mesonephros*) ²⁸⁰. Les autres sites d'hématopoïèse primitive, le foie fœtal et le sac vitellin, sont aussi affectés dans leurs fonctions. La régulation des cellules souches dans leur ontogénie est possible grâce à l'interaction entre *Gata2* et *Runx1*, comme le démontre la mort des embryons *Gata2*^{+/-} *Runx1*^{+/-} au milieu de la gestation ⁷. Le facteur de transcription Runx1 est requis uniquement pour la transition endothélio-hématopoïétique ²⁸¹. De Pater et al, par la génération d'un modèle murin conditionnel de délétion de *Gata2* sous le contrôle de promoteurs distincts, Vec (vasculaire endothélial) avant la génération de CSHs et Vav (hématopoïétique) après celle-ci, ont montré que *Gata2* était essentiel à cette transition ainsi qu'à la survie et à l'autorenouvellement des CSHs ²⁸².

L'hétérozygotie de *Gata2* (*Gata2*^{+/-}) chez la souris a aussi fourni un modèle d'étude de l'impact de GATA2 sur l'hématopoïèse adulte. Les souris adultes *Gata2*^{+/-} ont un nombre réduit de CSHs fonctionnelles, qui présentent une apoptose et un état de quiescence plus importants ²³⁸. Ces cellules ont une capacité diminuée dans la génération des précurseurs de la lignée granulo-macrophagique (GMP) alors que la génération de progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et lymphoïdes n'est pas affectée par ce déficit ²⁸³.

La surexpression importante de *Gata2* a aussi permis de mieux définir le rôle de GATA2 dans l'hématopoïèse adulte. Quand l'expression de *Gata2* est doublée dans les CSHs de souris, le nombre de cellules souches est diminué d'un facteur 40 ainsi que leur capacité à produire des colonies *in vitro* et leur capacité de greffe quand ces cellules sont transplantées dans la souris irradiée ²⁵¹. La surexpression de *Gata2* dans les CSHs de cordon les maintient dans un état de quiescence, via la modulation de gènes impliqués dans la régulation de la

prolifération des CSH, comme *Mef* et *Hes1*, ainsi que d'autres gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme *Ccnd3*, *Cdk4* et *Cdk6*²⁸⁴.

Récemment, le même groupe a étudié l'effet d'une surexpression modérée de *Gata2* dans un système de promoteur inductible²⁸⁵. Ils ont pu montrer que cette surexpression faible résultait en un blocage de différenciation des progéniteurs myéloïdes au stade GMP, accompagné d'une majoration de leur capacité de prolifération, et ce par activation des cibles de *Gata2*, *Mycn* et *Hoxa9*. Les différenciations lymphoïdes B et T sont altérées dans ce modèle. Cependant, ce modèle n'a pas permis la génération de phénotype leucémique chez les souris transplantées et/ou transgéniques, motivant l'étude de mutations additionnelles dans ce modèle.

Le niveau d'expression de GATA2 permet de réguler finement la balance auto-renouvellement/différenciation au niveau des CSHs, possiblement à travers un contact proche avec la niche hématopoïétique²⁸². D'autres auteurs ont aussi évoqué un effet direct sur la régulation de l'apoptose via l'interaction entre *Gata2* et la protéine anti-apoptotique *Bcl2l1* (BCL-XL)²³⁸.

Ces observations permettent de conclure que GATA2 agit à un dosage précis à des niveaux de différenciation spécifiques au niveau des CSH et des progéniteurs, reflétant le rôle important des partenaires de GATA2 nécessaire à la régulation fine de l'hématopoïèse.

Partie 5 - Mutations de GATA2

Les mutations du facteur de transcription GATA2 et leur implication dans la pathologie humaine sont décrites depuis 2011.

Les mutations germinales de GATA2 regroupent des mutations ponctuelles situées majoritairement sur les doigts de Zn, des mutations nulles situées en amont de ces régions et de courtes délétions de la zone régulatrice en + 9.5kb.

Seule l'inactivation de cette courte séquence régulatrice en +9.5kb a été étudiée dans un modèle murin et publiée, reproduisant le phénotype clinique.

Les mutations somatiques de GATA2 sont rares, hormis dans le groupe d'hémopathies myéloïdes avec mutations bialléliques de CEBPA.

L'implication du facteur de transcription GATA2 dans le compartiment des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques et son rôle important dans la régulation de l'expression génique, nous autorise à penser que ce gène peut être soumis à des altérations donnant naissance à des affections malignes. En 2011, les premières mutations germinales hétérozygotes de ce gène ont été identifiées par séquençage d'exome chez des patients et familles présentant des syndromes myélodysplasiques (SMD), des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) familiales, un déficit immunitaire (syndrome MonoMAC) et un syndrome d'Emberger (myélodysplasie avec lymphœdème)^{2,286,287}. Au-delà de ces formes, il s'agit d'un véritable syndrome complexe associant de façon hétérogène, des atteintes hématologiques, pulmonaires, dermatologiques, cardio-vasculaires, oncologiques, et ORL. Les mutations somatiques du gène GATA2 sont aussi retrouvées dans la survenue d'hémopathies malignes myéloïdes non familiales et seront abordées brièvement dans ce paragraphe.

Mutations germinales de GATA2

Les mutations germinales de GATA2 sont nombreuses, réparties sur tout le gène (Figure 17). Les mutations germinales décrites sont *de novo* ou sont transmises sur un mode autosomique dominant sans qu'il soit réellement possible de décrire actuellement la part réelle de formes *de novo* en raison de la difficulté de l'enquête familiale rétrospective.

La bibliographie fait état de 176 patients présentant des mutations germinales de GATA2, parmi lesquelles on retrouve des mutations faux-sens, non-sens, de petites ins/del décalant le cadre de lecture, des délétions partielles et complètes du gène, des délétions courtes

d'une région régulatrice sur l'intron 4. On peut classer ces mutations en ne considérant plus seulement le type de mutation mais les domaines fonctionnels prédisant les mêmes conséquences fonctionnelles, ce dernier choix apparaissant le plus judicieux.

Un large groupe de mutations concernent les doigts de Zn, dont le rôle est essentiel dans l'interaction protéine/protéine et protéine/ADN. Le plus souvent il s'agit de mutations faux-sens localisées le plus souvent sur le doigt de Zn C-terminal ou immédiatement après (environ la moitié, figure 1, article 3), mais aussi de délétions aboutissant à la perte du domaine C-terminal. Ces mutations doivent entraîner la production d'un transcrit stable et d'une protéine anormale : non ou hypo-fonctionnelle ou avec un effet dominant négatif ².

A l'opposé, un autre groupe de mutations incluant les délétions complètes du gène, les mutations décalant le cadre de lecture ou non-sens en amont des doigts de Zn (16%, figure 1, article 3) entraînent théoriquement soit une dégradation des ARNm non-sens (NMD, *nonsense-mediated decay*) et par conséquent l'absence de protéine traduite, soit la traduction d'une protéine très tronquée.

Enfin, parmi les nombreuses régions régulatrices de GATA2 pouvant potentiellement être soumises à des mutations ²⁷², une délétion intronique de 28pb localisée au niveau de l'enhancer de l'intron 4 emportant une E-box et un motif GATA a été retrouvée conjointement chez la souris et chez un patient avec un spectre clinique de mutation GATA2 ¹⁸⁴. Aucun patient ne présente cette atteinte dans la cohorte franco-belge mais un patient italien a été détecté à Toulouse. Les études fonctionnelles ont confirmé chez la souris l'imputabilité de cette délétion dans la reproduction du phénotype clinique et elle a, par la suite, été retrouvée chez d'autres patients, ainsi que des mutations ponctuelles (substitution C>T) affectant un motif de liaison pour ETS juste après l'élément composite de régulation en *cis* ²⁸⁸.

Que ce soit la délétion de 28 pb ou la mutation ponctuelle de cet enhancer, les essais de gène rapporteur montrent une réduction de l'activité de cet enhancer ainsi que du transcrit ARNm de GATA2 (réduction de 50 à 70% par analyse de l'ADNc possible par suivi des SNP hétérozygotes additionnels sur *GATA2*) associé à l'expression d'un profil transcriptionnel commun ²⁸⁸. Ceci supporte l'idée d'haploinsuffisance, soit par la diminution de production protéique, soit par la génération d'une protéine non fonctionnelle.

La détection des mutations repose ainsi sur le séquençage complet du contenu génique des séquences codantes, ainsi que de l'enhancer de l'intron 4, aucune mutation n'ayant été

rapportée dans les régions non traduites 5' ou 3' de l'ARN messager. En seconde approche, la recherche de délétion complète du gène par CGH (Comparative Genomic Hybridation) et/ou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) doit être réalisée.

L'existence de patients présentant le même phénotype et une réduction de l'expression allélique de *GATA2* sans mutation retrouvée, suggère que d'autres sites de régulations puissent être soumis à des mutations, mais jusque-là aucune équipe n'a publié de nouvelles altérations géniques, notamment sur les autres zones régulatrices situées en N-terminal^{1,288}. Des mécanismes de régulation épigénétiques telles que l'hyperméthylation ou la régulation par un microARN ne peuvent être exclus, comme cela a été décrit récemment dans la régulation de *GATA2*^{203,289}.

Mutations somatiques de GATA2

Des mutations somatiques de *GATA2* ont aussi été mises en évidence dans les régions codantes de *GATA2*, et impliquées dans la progression de la leucémie myéloïde chronique vers une crise blastique. Des études complémentaires *in vitro* ont montré que la mutation Leu359Val non seulement augmentait les capacités de transactivation de *GATA2* mais aussi majorait son effet inhibiteur sur PU.1 via une interaction protéique directe²⁹⁰.

Des mutations somatiques de *GATA2* associées à des mutations d'autres facteurs de transcription, comme *CEBPA*, ont été décrites dans le développement d'hémopathies myéloïdes sporadiques. Les LAM à caryotype normal (CN-LAM) et mutations bialléliques de *CEBPA* (*dmCEBPA*) représentent une entité clinique particulière associée à un pronostic favorable. Greif *et al.* ont rapporté initialement en 2012 l'association de mutations somatiques de *GATA2* et de *dmCEBPA* chez 13 patients parmi les 33 de leur cohorte de CN-LAM. Aucune mutation n'a été détectée parmi les 38 patients n'ayant pas de mutation *CEBPA* ni les 89 ayant une mutation monoallélique de *CEBPA*⁸¹. Ces mutations sont situées préférentiellement sur le doigt de Zn N-terminal, ne perturbant pas la liaison entre les 2 cofacteurs mais réduisant l'activité transcriptionnelle globale *in vitro* de ces 2 facteurs de transcription. L'impact pronostic n'a pas pu être apprécié dans ce faible effectif.

Fasan *et al.* retrouvent 21 patients sur 212 présentant une mutation *GATA2* dans une population similaire (LAM de risque intermédiaire), 18/98 patients présentant une mutation biallélique de *CEBPA* et 3/92 une forme sauvage de *CEBPA*. Les localisations des mutations de *GATA2* étaient identiques principalement sur le doigt de Zn N-terminal, 5 patients

présentant des mutations sur le doigt de Zn C-terminal et 1 patient 2 mutations en N- et C-terminal, les mutations étaient différentes des mutations germinales connues. Les analyses comparatives entre le diagnostic et la rechute ont montré que les mutations GATA2 étaient un évènement additionnel à la rechute⁸⁰. Les travaux ultérieurs ont permis de préciser ces données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques^{80,291-294}:

- association de *dmCEBPA* et mutation GATA2 dans 18 à 40% des cohortes, mais aussi dans 4 à 16% cas de *smCEBPA* dans 2 études^{291,293} ;
- plus de 80% des mutations sont des substitutions d'acides aminés situés dans les doigts de Zn ;
- l'acquisition de mutation de GATA2 semble secondaire à celle de *CEBPA*, qui reste un évènement de leucémogénèse précoce ;
- les mutations de *GATA2* et de *FLT3-ITD* ne sont pas mutuellement exclusives²⁹³ ;
- *GATA2* semble avoir un impact pronostic additionnel sur le bon pronostic conféré par l'existence de *dmCEBPA* dans 2 études^{80,292}, cependant une étude ne retrouve pas de signifiante²⁹¹. Deux études récentes sur 128 et 202 patients des groupes français et allemands confirment que les mutations de *GATA2* ne confèrent pas d'impact pronostic additionnel^{293,294} ;

Luesnick *et al.* se sont intéressés aux mutations de *GATA2* et à son expression dans une cohorte pédiatrique : 9.8% des patients présentant une LAM avec caryotype normal. Les données liées à la surexpression de *GATA2* semblent plus complexes à interpréter, cette étude semblant relier la surexpression de *GATA2* à un marqueur de pronostic défavorable indépendant au diagnostic²⁹⁵. Une étude précédente sur 112 adultes présentant une LAM avec caryotype normal a montré plus clairement que la surexpression de *GATA2* était aussi associée à un pronostic défavorable²⁹⁶.

Récemment, les mutations somatiques de *GATA2* ont aussi été retrouvées de manière relativement fréquente dans une forme rare de LAM, la LAM érythroblastique (22.4% versus 5.5% dans les autres formes cytologiques), les mutations sur le doigt de Zn N-terminal réduisent les capacités de transactivation de *GATA2* dans des cellules transfectées avec les protéines mutantes. L'expression des gènes de différenciation érythroïde est augmentée dans ce modèle mais sans néanmoins conférer un avantage sélectif ni un rôle transformant dans des modèles de différenciation *in vitro*²⁹⁷.

Chapitre 2. Résultats

En 2011, des mutations hétérozygotes germinales du facteur de transcription GATA2 ont été identifiées chez des patients présentant des syndromes cliniques à titre de MDS et LAM ², syndrome MonoMAC ^{286,298} et syndrome d'Emberger ²⁸⁷. Ces syndromes étaient décrits cliniquement depuis de nombreuses années, sans diagnostic génétique possible jusqu'à l'avènement des nouvelles techniques de biologie moléculaire comme le séquençage d'exome. La première publication clinique semble remonter à 1972, chez une famille islandaise présentant plusieurs cas de LAM, associées à des verrues, une trisomie 8 et une anomalie de Pelger-Huet ²⁹⁹. Puis a suivi la description d'Emberger en 1979 ³⁰⁰, relayée dans la région d'Occitanie par une publication dans la Presse Médicale en 1985 faisant état de l'association familiale de lymphoedème et de LAM (Attal et al, presse médicale, 1989).

En 2011, nous avons identifié une des premières familles à Toulouse avec 4 membres présentant une mutation germinale de GATA2 grâce à une analyse par séquençage d'exome. La présentation clinique de notre famille initiale retrouvant une neutropénie modérée chez l'ensemble des malades et précédant la survenue d'hémopathie, les premiers patients ont été diagnostiqués via le Registre National des Neutropénies Congénitales et ont fait l'objet d'une première publication ⁴ (Article 1). La mise en évidence de mutations de GATA2 au sein de ces familles a permis de mieux comprendre le spectre clinique et biologique de ce syndrome, qui dépasse largement le cadre immuno-hématologique. Actuellement, 78 patients ont été diagnostiqués et inclus dans le registre français, dont la prise en charge implique différents spécialistes d'organes (immuno-hématologues, pneumologues, infectiologues, dermatologues, oncologues, médecins vasculaires, internistes). Cette cohorte, qui est actuellement la plus large au monde, est en cours de publication (Pasquet et al, manuscrit en préparation, article 2).

Ces publications nous permettront de discuter des conséquences cliniques et biologiques des mutations hétérozygotes de GATA2, puis nous aborderons les recommandations thérapeutiques élaborées au sein du « Club GATA2 ». En tant que responsable de ce groupe de travail sur le plan national, j'ai rédigé ces recommandations dans des revues d'hématologie adulte et pédiatrique (cf. annexes).

Enfin, ces observations cliniques ont permis d'initier mon travail de recherche sur les conséquences fonctionnelles de 2 mutations GATA2, R396Q et R204X, situées sur des domaines fonctionnels différents. Ces travaux ont donné lieu à la rédaction de l'article 3,

(Pasquet et *al.*, manuscrit en préparation, article 3), et ces résultats ouvriront la discussion sur les conséquences fonctionnelles des mutations du facteur de transcription GATA2 dans la leucémogénèse.

Article 1, Blood. 2013 Jan 31;121(5):822-9

High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia.

Pasquet M, Bellanné-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B, Larochelle O, Petit A, Rohrlich P, Ferrand C, Van Den Neste E, Poirel HA, Lamy T, Ouachée-Chardin M, Mansat-De Mas V, Corre J, Récher C, Plat G, Bachelerie F, Donadieu J, Delabesse E.

blood

2013 121: 822-829
Prepublished online December 6, 2012;
doi:10.1182/blood-2012-08-447367

High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia

Marlène Pasquet, Christine Bellanné-Chantelot, Suzanne Tavitian, Naïs Prade, Blandine Beaupain, Olivier LaRoche, Arnaud Petit, Pierre Rohrlich, Christophe Ferrand, Eric Van Den Neste, Hélène A. Poirel, Thierry Lamy, Marie Ouachée-Chardin, Véronique Mansat-De Mas, Jill Corre, Christian Récher, Geneviève Plat, Françoise Bachelier, Jean Donadieu and Eric Delabesse

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/121/5/822.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Free Research Articles](#) (1990 articles)
[Myeloid Neoplasia](#) (1051 articles)
[Pediatric Hematology](#) (277 articles)
[Phagocytes, Granulocytes, and Myelopoiesis](#) (416 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



PHAGOCYTES, GRANULOCYTES, AND MYELOPOIESIS

High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia

*Marlène Pasquet,¹ *Christine Bellanné-Chantelot,² *Suzanne Tavitian,^{1,3} Naïs Prade,¹ Blandine Beaupain,^{4,5} Olivier LaRoche,^{1,6} Arnaud Petit,⁶ Pierre Rohrlach,⁷ Christophe Ferrand,⁷ Eric Van Den Neste,⁸ Hélène A. Poirel,⁹ Thierry Lamy,¹⁰ Marie Ouachée-Chardin,¹¹ Véronique Mansat-De Mas,^{1,3,12} Jill Corre,^{1,3,12} Christian Récher,^{1,3,12} Geneviève Plat,¹ Françoise Bachelier,¹³ *Jean Donadieu,^{4,6} and *Eric Delabesse^{1,3,12}

¹Department of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire Toulouse Purpan, Toulouse, France; ²Department of Genetics, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, Paris, France; ³Inserm U1037, Centre de Recherche sur le Cancer de Toulouse, Toulouse, France; ⁴French Severe Chronic Neutropenia Registry, Hôpital Trousseau, Paris, France; ⁵Department of Hematology, Hôpital Trousseau, Université Paris VI Pierre et Marie Curie, Paris, France; ⁶Department of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire Québec, Pavillon Hôtel Dieu de Québec, Québec, QC; ⁷Inserm, Unité Mixte de Recherche 1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, Université de Franche-Comté, Besançon, France; ⁸Department of Hematology, Cliniques Universitaires Saint-Luc and Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; ⁹Center of Human Genetics, Cliniques Universitaires Saint-Luc and Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; ¹⁰Department of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire Pontchaillou, Rennes, France; ¹¹Department of Hematology, Hôpital Robert-Debré, Paris, France; ¹²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France; and ¹³Inserm Unité Mixte de Recherche S996, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics, Université Paris-Sud, Clamart, France

Key Points

- Mutations of key transcription factor in myeloid malignancies.

Congenital neutropenia is a group of genetic disorders that involve chronic neutropenia and susceptibility to infections. These neutropenias may be isolated or associated with immunologic defects or extra-hematopoietic manifestations. Complications may occur as infectious diseases, but also less frequently as myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myeloid leukemia (AML). Recently, the transcription factor GATA2 has been identified as a new predisposing gene for familial AML/MDS. In the present study, we

describe the initial identification by exome sequencing of a GATA2 R396Q mutation in a family with a history of chronic mild neutropenia evolving to AML and/or MDS. The subsequent analysis of the French Severe Chronic Neutropenia Registry allowed the identification of 6 additional pedigrees and 10 patients with 6 different and not previously reported GATA2 mutations (R204X, E224X, R330X, A372T, M388V, and a complete deletion of the GATA2 locus). The frequent evolution to MDS and AML in these patients reveals the importance of screening GATA2 in chronic neutropenia associated with monocytopenia because of the frequent hematopoietic transformation, variable clinical expression at onset, and the need for aggressive therapy in patients with poor clinical outcome. (Blood. 2013;121(5):822-829)

Introduction

Congenital neutropenia is a group of genetic disorders that involve chronic neutropenia and susceptibility to infections. Mutations have been described previously in congenital neutropenia that is isolated (eg, mutations of *ELANE*), associated with immunologic defects (eg, mutations of *CXCR4* or *WAS* genes), or involves extra-hematopoietic manifestations, the most frequent being *HAX1* (Kostmann disease), *SDBS* (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome), or *G6PC3*.¹ Complications may occur in congenital neutropenia, essentially infectious diseases but also less frequently myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myeloid leukemia (AML). The rate of evolution of patients with severe congenital neutropenia is 10.8% at 20 years increasing to 18.8% in patients with *SDBS* mutations.²

MDS is a clonal hematopoietic disorder resulting in ineffective hematopoiesis and frequently evolving to AML. Most frequently, MDS and AML are sporadic and affect primarily elderly patients with a median age more than 65 years. In contrast, genetic susceptibility to MDS and/or AML is infrequent. *RUNX1* and *CEBPA*, 2 oncogenes encoding transcription factors, have been linked to familial AML and MDS.³ Germline heterozygous mutations of *RUNX1* occur mostly in the Rel homology domain, leading to the loss of its DNA-binding capacity³ and being associated with a familial platelet disorder and an autosomal-dominant transmission.⁴ CCAAT enhancer binding protein α (*CEBPA*) is mutated in familial AML with an autosomal-dominant transmission and a high penetrance.⁵ In addition to

Submitted August 1, 2012; accepted November 18, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 6, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-08-447367.

*M.P., C.B.-C., S.T., J.D., and E.D. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2013 by The American Society of Hematology

RUNX1 and *CEBPA*, mutations in the telomerase RNA (*TERC*) or reverse transcriptase (*TERT*) subunits have also been identified.⁶

Recently, *GATA2* has been identified as a new predisposing gene for familial AML/MDS.⁷⁻¹¹ *GATA2* is a member of the GATA transcription factor family characterized by a 2 zinc finger domains binding to the DNA sequence WGATAR and a transactivation domain. Heterozygous point mutations located in the second zinc finger of *GATA2* have been identified initially in 4 families with MDS and AML.⁷ Point mutations have been also identified in diseases that overlap with familial AML/MDS, such as Emberger⁸ and MonoMAC syndromes.^{12,13} Emberger syndrome is an autosomal-dominant primary lymphedema with a predisposition to AML.^{14,15} The MonoMAC syndrome is characterized by a severe deficiency of monocytes, B-lymphocytes, and natural killer (NK) cells, along with nontuberculous mycobacterial, fungal, and viral infections and an autosomal-dominant transmission in most cases.¹⁰

In the present study, we describe the initial identification by exome sequencing of *GATA2* mutation in a mother and her 3 children associated with a prior history of chronic mild neutropenia evolving to AML and/or MDS. Subsequent analysis of the French Severe Chronic Neutropenia Registry allowed the identification of 10 additional patients with *GATA2* mutations in 6 pedigrees with unexplained mild neutropenia in at least 1 patient of the pedigree.^{1,2,16}

The frequent evolution to MDS and AML of patients with *GATA2* mutations reveals the importance of screening for this mutation in chronic neutropenia, especially when associated with monocytopenia because of frequent hematopoietic transformation, variable clinical expression at onset, and the need of aggressive strategy therapy in patients with poor clinical outcome.

Methods

Patients

Patient pedigree 1 samples were obtained after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and were stored at the HIMIP (Hématologie-Inserm Midi-Pyrénées) collection (declared to the Ministry of Higher Education and Research as DC 2008-307 collection 1). Clinical and biologic annotations of the samples have been declared to the Comité National Informatique et Libertés.

French Severe Chronic Neutropenia Registry

Patients were registered in the French Severe Chronic Neutropenia Registry, which was established in 1993¹ to collect data from 35 pediatric hematology-oncology clinical units. The inclusions criteria of the registry are: neutrophil count lower than 0.5 G/L observed at least 3 times in a period of 3 months or a neutrophil count lower than 1 G/L observed at least 3 times in a period of 3 months associated with infection. Systematic recording of infectious episodes was obtained from the patients' written medical history. Severe infections were defined as those that would be life-threatening without appropriate antibiotic or antifungal therapy. Minor infections were defined as those for which patients did not seek medical attention (eg, stomatologic, ear, nose, and throat infections). Warts were considered when they numbered ≥ 10 or when they presented as genital condylomata acuminata. The patients or their parents gave their written informed consent for genetic testing. We selected for *GATA2* by screening 14 probands from a series of 544 patients included in the registry. The selection criteria were the absence of mutations for the major genes involved in congenital neutropenia (*ELANE*, *CXCR4*, *SBDS*, *HAX1*, and *G6PC3*; $n = 288$ patients) and the presence of clinical features associated with *GATA2* mutations: leg lymphedema, warts, and evolution to MDS/AML. The median age at the last follow-up was 18 years (range, 7-56).

Karyotype

Karyotypes were established from bone marrow (BM) aspiration using standard procedures and described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.

CGH analysis

For comparative genomic hybridization (CGH) analysis, genomic DNA samples were analyzed for copy number changes using Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays (for pedigree 1) or CytoScan HD arrays (for other pedigrees when material was available). Sample preparations and hybridizations were performed using Genome-wide Human SNP *Nsp/Sry* and CytoScan assay kits (Affymetrix) according to the manufacturer's protocol. Analysis of copy number state was done using BRLMM-P-Plus algorithm with regional GC correction, embedded in Genotyping Console Version 2.0 and Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix).

Exome sequencing

A total of 3 μ g of DNA extracted from the BM sample of patient number 6225 (blast infiltration, 30%) was fragmented by sonication to 150-200 bp and ligated to an oligonucleotide adaptor. Fragments were purified and amplified by PCR for 6 cycles. Five hundred nanograms of this PCR product were hybridized to the SureSelect Human All Exon Kits Version 2 (Agilent Technologies), covering 44 Mb of the human exome during 24 hours. After washing, the eluate was amplified by PCR for 12 cycles. The sequencing of the exome was performed by IntegraGen using a HiSeq 2000 (Illumina). Base calling was performed using Illumina RTA Version 1.8 using default settings. Sequencing data were analyzed with Illumina CASAVA1.7 software and the human genome reference sequence hg19. Average depth was 124 \times . Single-nucleotide variants (SNVs) were filtered using COSMIC v53 and dbSNP135 databases for nonsynonymous variants with a reading call higher than 5, leading to the identification of 8 SNVs: EPHB6 T483P, ERN V458G, *GATA2* R396Q, IMPG2 P1161L, KDM5C V858G, MAST4 K2422E, NEK11 D87Y, and TTN P4737R. Five were confirmed by classic Sanger sequencing: EPHB6 T483P, *GATA2* R396Q, IMPG2 P1161L, NEK11 D87Y, and TTN P4737R (primer sequences are provided in supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

GATA2 mutation screening

GATA2 mutations in exons 2-6 were searched for by PCR and Sanger sequencing (primer sequences are listed in supplemental Table 1). Sequences were analyzed with Sequencher (Genescode). Mutations are numbered as recommended by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/>) using the reference sequence NM_032638.4.

Chromosome 3 microsatellite genotyping

The familial segregation of the *GATA2* R396Q mutation (*GATA2* gene location according to hg19, chr3:128.2 Mb) in pedigree 1 was investigated using 4 highly polymorphic short tandem repeats (STRs), 2 of which were centromeric to *GATA2* (D3S3606 and D3S3607, located at chr3:127.2 Mb and chr3:127.3 Mb, respectively) and 2 of which were telomeric to *GATA2* (D3S1587 and D3S1292 located at chr3:130.8 Mb and chr3:131.6 Mb, respectively). STRs were amplified by PCR (primer sequences are provided in supplemental Table 1) and analyzed by GeneScan analysis performed on an Applied Biosystems 3130XL.

Statistical methods

Stata Version 10 software was used for all statistical analyses. The median, lower, and upper interquartile values depict the distribution of quantitative variables. For survival analyses, end points were death and the first episode of cancer. The period taken into account was the time interval from birth to the first date when the event was observed or when no event occurred to the last examination. The Kaplan-Meier method was used to estimate survival rates. The cutoff date was July 1, 2012.

Results

Clinical presentations of pedigree 1

We investigated a family in which the mother (patient number 6227; P1, II, 4) developed at 35 years of age an AML M2 associated with myelodysplasia-related changes. Karyotype was normal. She had a history of recurrent gingivitis and skin infection consistent with chronic neutropenia (12 years before AML) and monocytopenia. She presented with aspergillosis during induction therapy and received several lines of chemotherapy because of a refractory disease. She died from CMV pneumonia without achieving complete remission.

The patient had 3 sons and 2 miscarriages. Three years later, at age 14, her second child (patient number 6225; P1, III, 3) developed an AML M2 associated with myelodysplasia-related changes with a similar cytologic presentation to his mother. The karyotype identified a trisomy 11 and a partial deletion of chromosome 7. He had a previous history of recurrent infections and mild neutropenia. In first complete remission, he received a matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and is still in remission 18 months after the allograft. His elder brother (patient number 6165; P1, III, 2), 16 years of age, also had a history of chronic neutropenia with a chronic EBV replication in the gut and a severe respiratory distress syndrome requiring supplemental oxygen at age 14 linked to pulmonary bronchiectasis. Examination of the blood and the BM revealed a refractory cytopenia with multilineage dysplasia. The karyotype was normal. A global immunologic defect was identified with a very low number of CD14⁺ monocytes, CD19⁺ B-cell lymphocytes, and CD3⁺/CD56⁺ NK cells, along with a normal CD3⁺ T-cell lymphocyte count (supplemental Table 2). He underwent HSCT with a matched unrelated donor in April 2012. The youngest brother (patient number 6224; P1, III, 5), 5 years of age, presented with recurrent fever and chronic EBV replication in the blood. Blood count and BM examination were normal. Karyotype identified a complete monosomy 7 leading to the diagnosis of unclassifiable MDS (MDS-U). Matched unrelated BM transplantation was performed and was complicated by a grade 4 cutaneous GVHD requiring intensive immunosuppressive therapy. Fourteen months after the transplantation, no severe infection was noted and immunologic recovery was obtained.

Identification of a germline GATA2 R396Q mutation in pedigree 1

Because a familial MDS/AML was suspected in pedigree 1, we looked for a putative germline mutation. *RUNX1* and *CEBPA* were not mutated in any member of this family (data not shown). No recurrent deletion, amplification, or uniparental disomy was detected by CGH (data not shown). Therefore, we performed exome sequencing on the AML diagnosis sample of the second son (patient number 6225). Five SNVs were identified further and confirmed by classic Sanger sequencing: EPHB6 T483P, GATA2 R396Q, IMPG2 P1161L, NEK11 D87Y, and TTN P4737R. We examined the other members of the family (mother, father, the 2 other sons, maternal grandfather, maternal grandmother, and maternal cousins) for the presence of these variations. Two variations, GATA2 R396Q (c.1187G A; supplemental Figure 1) and NEK11 D87Y, both genes located on the chromosome 3 that are separated by 2.7 Mb, were identified in the mother and in the 3 children's samples but were absent in the father's sample. The GATA2 R396Q variation was not identified in the maternal

grandparents' DNA, but the NEK11 D87Y variation was detected in the maternal grandfather's DNA sample. Because the maternal grandfather had no clinical or biologic phenotypes, we focused our analysis on the GATA2 R396Q mutation. We investigated its origin using 4 highly polymorphic short tandem repeats, 2 centromeric to GATA2 (D3S3606 and D3S3607) and 2 telomeric to GATA2 (D3S1587 and D3S1292). Genotyping STR analysis demonstrated that the chromosome 3 allele bearing the GATA2 R396Q mutation came from the maternal grandfather, although the mutation was not detected in his DNA sample (supplemental Figure 2), suggesting a de novo event in patient II-4 (patient number 6227).

GATA2 mutations are identified in chronic neutropenia

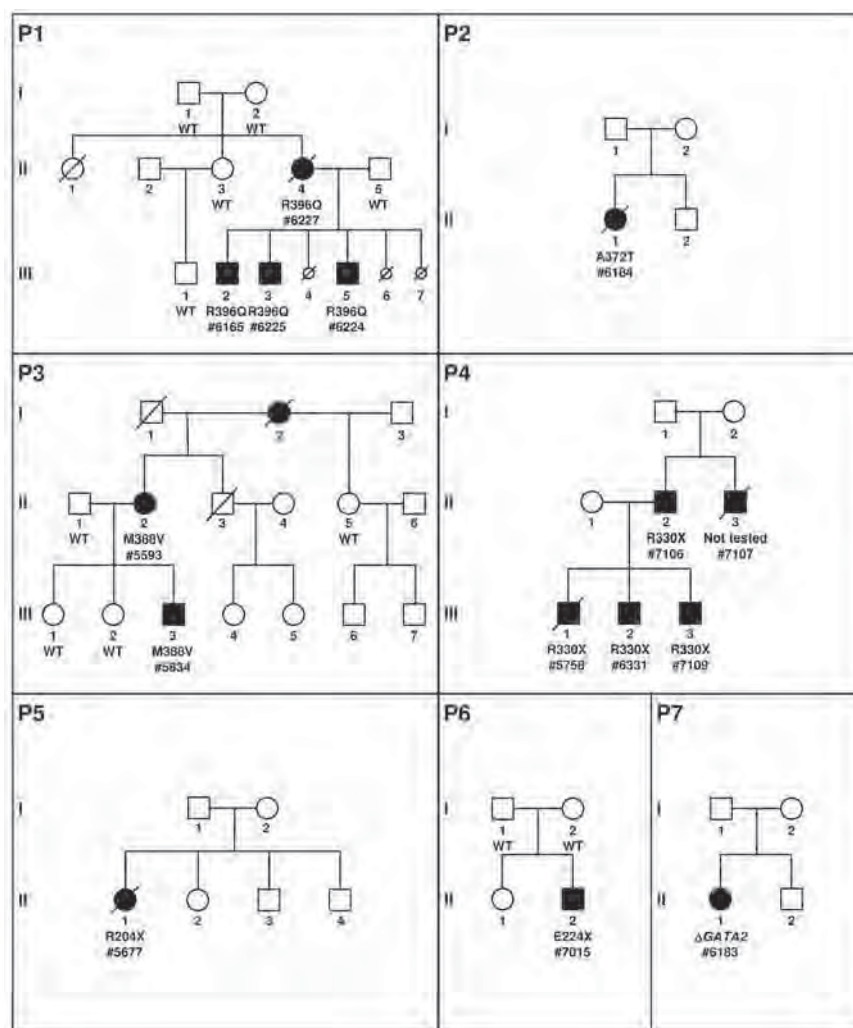
Because the clinical presentation of pedigree 1 was initially chronic neutropenia, we investigated the presence of mutations of GATA2 in the French Severe Chronic Neutropenia Registry. Fourteen unrelated proband cases were selected for the presence of a neutropenia, a WHIM-like syndrome with possible evolution to MDS/AML, and their negativity for mutations of the major genes involved in congenital neutropenia (*ELANE*, *CXCR4*, *SBDS*, and *G6PC3*). We identified 6 mutations of GATA2 among these 14 cases, 5 point mutations and a large deletion of 61 kb completely overlapping the GATA2 locus. In 2 of these 6 pedigrees (P3 and P4, Figure 1), we identified a GATA2 mutation in 4 affected relatives, 1 in P3 and 3 in P4. Overall, we detected a GATA2 mutation in 14 white patients.

Patient number 6184 (P2, II, 1) was diagnosed at the age of 13 with an AML M5. The karyotype identified a translocation involving *MLL* along with a monosomy 7. She underwent treatment with intensive chemotherapy that was complicated by pulmonary aspergillosis. Her brother and parents are healthy. A complete remission was obtained, but she developed a progressive loss of neutrophils, monocytes, B cells, and NK cells associated with numerous infections (Table 1 and supplemental Table 2). Genetic evaluation finally identified a heterozygous missense GATA2 A372T mutation (c.1114G > A, supplemental Figure 1). The patient died 5 years later from an H1N1 influenza infection in complete remission.

Patient number 5593 (P3, II, 2) developed chronic neutropenia at the age of 30 associated with numerous HPV-induced warts since age of 14 years. The BM smear did not identify myelokathexis features and the case was considered to be a WHIM-like syndrome. She suffered from a chronic genital papillomavirus infection evolving to carcinoma. She had additional infections such as pulmonary aspergillosis, recurrent oral herpes, and onychomycosis infections. A deficit of monocytes, B cells, and NK cells was detected, the T-cell count remained normal (Table 1 and supplemental Table 2). We identified a heterozygous missense GATA2 M388V mutation (c.1162A > G, supplemental Figure 1). She had 3 children, 1 of whom developed MDS detected in the evaluation of asthenia at the age of 12 (patient number 5834; P3, III, 3). He was treated by HSCT and is still in complete remission 2.5 years after the transplantation.

Patient number 5758 (P4, III, 1) presented with numerous and extensive warts associated with a mild neutropenia since the age of 6, a profound monocytopenia, and deficiencies of B cells and NK cells (Table 1 and supplemental Table 2). He developed, at the age of 18, AML with myelodysplastic features associated with a der(1;7)(q10;p10) leading to a monosomy 7q and a trisomy 1q. A heterozygous nonsense GATA2 R330X mutation (c.988C > T, supplemental Figure 1) was identified. He presented with an *Aspergillus* infection during induction therapy and died from severe respiratory distress. His younger brother (patient number

Figure 1. Pedigree description. P1 to P7 describes the pedigrees. Circles represent females and squares males. Parents are connected by a single horizontal line, and vertical lines indicate their offspring. Offspring are connected by a horizontal line. Siblings are placed from left to right according to birth order and are labeled with Arabic numerals. Each generation is indicated by a Roman numeral. Circles and squares are black when neutropenias have been formally identified. If a patient is dead, a diagonal line is placed over the circle or square. Smaller circles with a diagonal line indicate miscarriage (P1, III, 4; P1, III, 6) or termination because of AML induction treatment (P1, III, 7). Patients tested are indicated by the result of the GATA2 screening and a number (patient number 7107 was not analyzed). The absence (wild-type, WT) or presence of a GATA2 mutation (protein variation or complete deletion indicated by Δ) is indicated below the symbol of the patient tested.



6331; P4, III, 2) presented recurrent otitis during infancy and had a long period of extensive warts since the age of 12. Blood and medullar tests revealed mild neutropenia; monocytopenia; B-, NK-, and dendritic-cell deficiencies; and an hypoplastic BM with a karyotype harboring the same chromosomal alteration observed in the BM of his brother, a der(1;7)(q10;p10) leading to a partial monosomy 7q. At 20 years of age, he underwent HSCT with an unrelated donor. He is still in hematologic and cytogenetic remission 2 years after HSCT. His younger brother (patient number 7109; P4, III, 3) presented at the age of 15 with severe meningococcal infection associated with mild hematologic abnormalities and an identical *GATA2* mutation. Blood and medullar tests revealed a mild neutropenia and thrombocytopenia, B-cell deficiencies, and a very slightly hypoplastic BM with a normal karyotype. The father (patient number 7106; P4, II, 2) has the same mutation. Blood and medullar tests were normal except for a mild B-cell deficiency. The paternal uncle (patient number 7107; P4, II, 3), although not tested, has a presentation evocating a *GATA2* mutation with recurrent warts associated with mild neutropenia and monocytopenia. He died suddenly at the age of 36 from aortic dissection.

Patient number 5677 (P5, II, 1) presented with WHIM-like syndrome with HPV-induced warts, clinical features of extended sarcoidosis, neutropenia, lymphopenia, monocytopenia, and a severe defect in NK cells.¹⁷ She developed a disseminated *Mycobacterium avium* complex infection and later an AML M4 subtype. She

died from a refractory disease after several lines of chemotherapy. We identified a heterozygous *GATA2* R204X mutation (c.610C > T, supplemental Figure 1).

Patient number 7015 (P6, II, 2), born from healthy parents, presented with several warts in the extremities and on the forehead at the age of 4. A routine blood test performed at 11 years of age revealed a mild chronic neutropenia, monocytopenia, and mild lymphopenia with a profound B-cell defect (Table 1 and supplemental Table 2). We identified a heterozygous nonsense *GATA2* E224X mutation (c.670G > T, supplemental Figure 1) that was not detected in the parents' samples. Initial treatment based on G-CSF and corticosteroids showed a moderate efficacy on neutropenia.

Patient number 6183 (P7, II, 1) is a young girl with an initial presentation of neutropenia evolving to MDS associated with the loss of chromosome 7 (Table 1 and supplemental Table 2). She had a large monoallelic deletion of 61 kb (Chr3:128.17-128.23 Mb) completely encompassing *GATA2* and 2 other genes, *DNAJB8* and *LOC90246* (supplemental Figure 1). She was allografted and is still alive 1 year later.

Preleukemic hematologic and immunologic parameters

Before the evolution to MDS or AML, a median of 4 blood counts were available per patient. In all cases, hematologic parameters fluctuated with time, except for monocytes, which remained low.

Table 1. Biologic and clinical presentations of patients with GATA2 mutations

Patient ID no.	GATA2 mutation	Blood count before MDS/AML, median				Karyotype	Initial manifestation (age in y)	Hematological complications, therapy outcome (age in y)	Infections (age in y)	Other features (age in y)	Vital status (age at last follow-up, y)
		ANC, G/L	ALC, G/L	AMC, G/L	Platelets, G/L	Hb, g/dL					
P1, II, 4 #6227	R396Q c.1187G > A	0.7	1	0.03	332	11.8	Neutropenia during routine pregnancy test (23)	AML (35)	Recurrent gingivitis Skin infections	2 miscarriages	Dead (37)
P1, III, 2 #6165		1.6	0.8	0.07	262	12.5	Severe pneumonia (16) Intermittent neutropenia	Refractory disease MDS (16) HSCT	Died of CMV infection (37) Severe pneumonia (16) Chronic EBV replication in gut pre-HSCT	Pulmonary embolism during pneumonia Factor V Leyden	Alive (18)
P1, III, 3 #6225		2.0	2.6	0.03	332	12.8	47,XY,+1[1]/47,si,der(7)(q32)[2]/ 47,si,der(7)(p21ter>7q11::7q22q31)[14]/ 46,XY[1]	AML (14)	Recurrent infections (bronchitis/pneumonia) since age of 12	Inguinal hernia (1) Thigh fibroma (3) Factor V Leyden	Alive (16)
P1, III, 5 #6224		1.3	1.7	0.36	180	11.1	45,XY,-7[17]/46,XY[4]	Pneumonia (12) Routine evaluation HSCT	Recurrent fever Chronic EBV replication in blood		Alive (7)
P2, II, 1 #6184	A372T c.1114G > A	1.2	0.2	0.02	92	9.9	45,XX,-7(t(1;19)(q23;p13.3)/ 47,ide, +15,+20	AML (13) HSCT	Pulmonary aspergillosis Skin lesions, recurrent oral HSV, gastrointestinal infections		Dead (18)
P3, II, 2 #5593	M388V c.1162A > G	1.8	0.3	0	163	11.6	Skin and genital HPV (14)	Surgery	Chronic genital HPV with oncogenic evolution Warts (5)	2 healthy girls	Alive (54)
P3, III, 3 #5834		1.2	2.2	0.04	84	11.2	Asthenia Mild neutropenia Macropytosis (13)	MDS (13) HSCT	Skin infection (<i>Staphylococcus aureus</i>)		Alive (16)
P4, III, 1 #5758	R330X c.988C > T	1.4	1.3	0.04	148	14.5	46,XY,+1,der(1;7)(q10;p10),9qh+q15/ 46,XY[5]	Warts (6) Routine evaluation (17)	Died of aspergillosis in induction (18) Warts (6)		Dead (18)
P4, III, 2 #6331		1.7	1.1	0.02	154	13.5	46,XY,+1,der(1;7)(q10;p10)[2]/ 46,XY[9]	Warts (12) Routine evaluation (17)	Warts (12) Recurrent bronchitis		Alive (21)
P4, III, 3 #7109		1.9	2.3	0.17	180	12.2	46,XY[20]	Meningitis (15) Routine evaluation (19) Routine evaluation (51)	Meningitis (15)		Alive (19)
P4, II, 2 #7106		2.6	0.5	0.48	152	15	46,XY[20]	Profuse warts (31)	Warts (31)		Alive (56)
P4, II, 3 #7107	Not studied	2.2	1.0	0.05	133	13.3	ND	AML-M2 with dysplasia (17) Refractory disease HSCT	Died of aspergillosis in induction (18) Warts (6)	Aortic dissection (36)	Dead (36)
P5, II, 1 #5677	R204X c.610C > T	1.2	1	0.06	153	12.8	46,XX,der(9)(1;9)(q12;q12), t(9)(q12;q34)[15]/46,XX[9]	Skin rash Mild neutropenia and lymphopenia (20)	Disseminated mycobacterial infection Warts		Dead (27)
P6, II, 2 #7015	E224X c.670G > T	1.1	1.5	0.28	148	12	ND	Warts (4)	Warts (4)		Alive (17)
P7, II, 1 #6183	Complete deletion	0.8	1	0.02	108	10.4	45,XX,-7(11)/45,ide,del(3)(p273)(3)/ 46,XX[1]/47,XX,+8[2]/46,XX[21]	Mild neutropenia (11) Severe infection (12) MDS (13) HSCT	Bacterial pneumonia Skin abscess	Urogenital tract malformations	Alive (15)

GATA2 mutations are indicated as protein (first line) or nucleotide (second line) variations. Complete blood count was collected during routine at baseline before HSCT in absence of clonal hematopoiesis.

ANC indicates absolute neutrophil count; ALC, absolute lymphocyte count; AMC, absolute monocyte count; Hb, hemoglobin; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; MDS, myelodysplastic syndrome; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; and HPV, human papillomavirus.

The median neutrophil count was 1.5 G/L (25th percentile: 1.2; 75th percentile: 2.0), although the count was mildly diminished, all patients experienced at least once a neutropenia between 0.5 and 1.2 G/L. The monocyte count was very low, with a median value of 0.05 G/L (25th percentile: 0.03; 75th percentile: 0.17). The lymphocyte count was also low, with a median at 1.1 G/L (25th percentile: 1.0; 75th percentile: 1.7); with B cells and NK cells were also low. The hemoglobin and platelet counts were at the lower range of normal values with a median of 12.5 g/dL (25th percentile: 11.2; 75th percentile: 13.4) and 152 G/L (25th percentile: 125; 75th percentile: 180), respectively. BM smears were available at baseline for 4 patients. The differential counts were within the normal range without evident myeloid cytologic abnormalities. The immunologic standard evaluation, even though it was not systemically performed, revealed mild abnormalities (supplemental Table 2). Immunoglobulin levels were almost in the normal range. In the 2 cases studied (patient number 6165 and 6184), the vaccine antigen response was normal (supplemental Table 2).

Associated morbidities

Overall, the main clinical features identified in these patients are the presence of warts at the initial diagnosis, frequent infections, and evolution to MDS and/or AML. Two patients (patient numbers 5677 and 6184) had infection profiles compatible with MonoMAC syndrome. Recurrent pneumonia was present in 5 patients and severe and chronic warts and/or genital HPV was observed in 6 patients. The induction therapy of AML was complicated by lung aspergillosis in 2 patients of 4 who have received this therapeutic approach, and 1 additional patient (patient number 5593) suffered from lung aspergillosis along with genital cancer. Among the 3 older patients, 2 had presented severe vascular complications, 1 with a lethal aortic dissection at the age of 36 (patient number 7107) and 1 cardiac infarct at the age of 50 in a woman without risk factors (patient number 5593). One patient (patient number 6183) presented with an urethral malposition that was corrected at the age of 2, and 1 patient (patient number 6225) presented with a thigh fibroma at the age of 3. In our series, none of the patients bearing *GATA2* mutations exhibit lymphedema or deafness.

Clinical evolution

Survival rates were 77% (at 20 years) and 62% (at 30 years) in this series of 14 patients with *GATA2* mutations (Figure 2A). Five deaths were recorded, 3 as a direct consequence of the leukemic evolution (patient numbers 6227, 5758, and 5677), 1 related to a flu-mediated pneumonia in a patient in complete remission of AML with immunodeficiency (patient number 6184), and 1 in a patient who died from an aortic dissection at the age of 36 (patient number 7107). The risk of malignant transformation was extremely high, because 6 of 14 patients with *GATA2* mutations developed a refractory cytopenia with multilineage dysplasia and 4 patients developed AML (Figure 2B). The median age at the diagnosis of MDS or AML was 15 years (range, 7-35). The risk of transformation at the age of 10, 20, or 30 was, respectively, 6%, 54%, and 63% (Figure 2B). The outcome once the MDS or the AML occurred was extremely poor: none of the patients treated only by chemotherapy was alive in contrast to the 6 patients receiving HSCT (Table 1).

Discussion

We identified 7 different *GATA2* mutations in 14 patients coming from 7 pedigrees (Figure 1). The molecular consequences of the

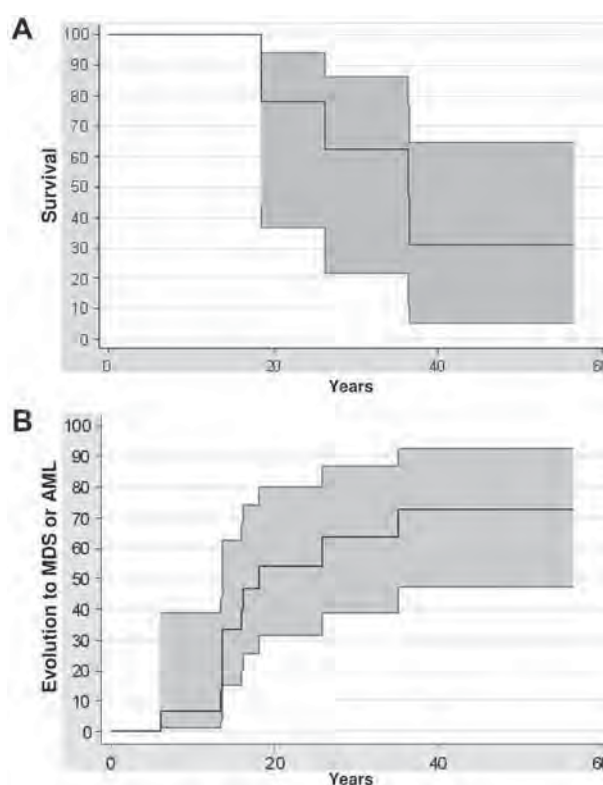


Figure 2. Clinical evolution. (A) Kaplan-Meier survival curve of *GATA2*-mutated patients. Confidence intervals of 95% are indicated. (B) Evolution of *GATA2*-mutated patients to MDS or AML from birth to evolution to MDS or AML or last follow-up. Confidence intervals of 95% are indicated.

mutations identified here can be classified in 2 distinct groups, the first with mutations located in or close to the second *GATA2* zinc finger (A372T mutation in P2 located between the third [C370] and fourth [C373] cysteines of the zinc finger, M388V in P3 and R396Q in P1) and the second with the complete loss of 1 allele of *GATA2* (P7) or creation of a stop codon leading to the loss of the second zinc finger (R330X mutation in P4 located in the first zinc finger, R204X [P5] and E224X [P6] mutations leading to the loss of the 2 zinc fingers). These nonsense mutations are likely to be sensitive to nonsense-mediated decay and would be null alleles similar in effect to whole gene deletions. Only the mutation R396Q in P1 has been described previously in 1 case of MonoMAC syndrome.¹⁸

Mutations of *GATA2* described previously^{7-10,12,13,19,20} are highly heterogeneous (supplemental Table 3), ranging from the creation of a stop codon (R337X), a frameshift mutation scattered over the whole coding frame (R78, G81, L105, A194, G200, D259, N317, L332 and A341), deletions (ranging from large deletions encompassing the whole *GATA2* locus to smaller deletions such as codons 1-290, codons 340-381, codons 341-346, and codons 362-365 or T355), and point mutations (located close to the second zinc finger domain with the exception of P254L: P304H, C319SC, T344M, T354M, L359V, R361L, R362Q, N371K, C373R, R396W, R396Q, and R398W). The majority of *GATA2* mutations have been identified in MDS/AML, Emberger, or MonoMAC syndrome patients.^{7,8,12,13,20} The L359V mutation and the deletion of codons 341-346 have been exclusively identified in myeloid transformation of chronic myeloid leukemias and are acquired.¹⁹ Only 3 of these mutations (L359V, T354M, and M355del) have been functionally tested by gel-shift or luciferase assays.^{7,19} The L359V has an opposite effect to the T354M and M355del mutations, with a gain of function effect for the former and a loss of function for the latter. The spectrum of *GATA2* mutations in MDS/AML, Emberger, or

MonoMAC syndrome patients is large.¹⁹ In our cases and in other cases reported with germline *GATA2* mutations, no clear correlation between genotype and phenotype can be identified, suggesting that these clinical presentations are a spectrum of the same disease.^{7-9,12,13}

The clinical evolution in MDS or AML of patients with germline *GATA2* mutations is frequently associated with a partial or complete deletion of chromosome 7: 6 of 11 patients in our study (2 with the R330X mutation, 1 with the A372T mutation, 2 with the R396Q mutation, and 1 with deletion of *GATA2* locus), 4 of 10 patients in Kazenwadel et al (T354M, 2 distinct large deletions of *GATA2* locus and a frameshift starting from L332),¹⁰ 6 of 28 patients in Hahn et al (T354M or deletion of T355),⁷ and the case described by Bodor et al (T354M),⁹ suggesting that the monosomy 7q is a recurrent secondary event linked to the overt transformation. Loss of the long arm of chromosome 7 is a frequent event in MDS and AML. In addition to *RUNX1* and *CEBPA* mutations, monosomy 7 was associated with pure familial MDS/AML in 14 pedigrees with an autosomal-dominant transmission and a young age (< 18 years).²¹ The different parental origins of the remaining chromosome 7 within the same family led to the hypothesis of the existence of a “mutator gene” located outside of chromosome 7.²¹ *GATA2* might be this putative mutator gene suggested by Minelli et al.²¹ *GATA2* mutation could act as a preleukemic event followed by an overt transformation due to the loss of genes located in the long arm of chromosome 7.

The main genes involved in congenital neutropenia were characterized during the last decade, with *ELANE* being involved in half of them (for review, see Donadieu et al¹). In the present study, we identified *GATA2* mutations as a cause of congenital mild neutropenia associated with a high risk of leukemic transformation. Monocytosis is frequently associated with neutropenia.¹ In marked contrast, our patients with *GATA2* mutations presented with monocytopenia with a median of 0.05 G/L.

Patients of 2 of the pedigrees described herein (P3 and P5) have a syndrome related to the WHIM syndrome, although the BM myelokathexis feature was missing. They display the typical WHIM-associated dysfunctions of the CXCR4 chemokine receptor pathway without mutations of *CXCR4* that are frequent in WHIM syndrome.^{17,18,22} The monocytopenia, together with the infectious spectrum composed by pyogenic or mycobacteria infections and HPV-related warts, have some similarities to the MonoMAC syndrome. In support of this possibility, we found that both patients harbor heterozygous mutation of *GATA2*. Nevertheless the potential mechanisms of pathogenesis remain largely unknown. Functional studies are needed to investigate this and the potential effects of *GATA2* mutations on dysfunction of the CXCR4 pathway, which account for the pancytopenia of WHIM patients.²³

Identification of *GATA2* mutations is critical for the management of these patients. The serious and usually sudden infections occurring in 4 patients led to their deaths. The spectrum of infections associated with *GATA2*-deficient neutropenic patients encompasses bacterial and fungal infection with frequent skin or mucosal involvements and a higher risk of mycobacterial and viral infections, reflecting either the profound deficit of NK cells in MonoMAC syndrome¹³ or the importance of the cooperation between neutrophils and NK cells.²⁴ The present study also

highlights the frequent early myeloid transformation in patients carrying a *GATA2* mutation associated with a poor outcome linked to a refractory status of disease after initiation of chemotherapy. Two patients in our series (P1, patient number 6227 and P6, patient number 7015) were treated with hematopoietic growth factors without benefits (lenograstim followed by sargramostim in one patient and filgrastim in the other).

Screening of *GATA2* mutations in patients with mild chronic neutropenia associated with monocytopenia may be important. We propose limiting the use of hematopoietic growth factors and implementing intensive treatment such as allograft in patients with neutropenia and *GATA2* mutations as soon as an unrelated donor has been identified. Genetic counseling should also be considered for patients with *GATA2* mutations because of the high clinical penetrance and poor survival rates.

Acknowledgments

The authors thank the patients and their families for their participation in this study; the Association 111 des Arts for its support; Michel Leporrier for collection of blood samples of P1; Cyril Broccardo for careful reading of the manuscript; and Miikka Vikkula and Ha-Long Phuoc Nguyen (Human Molecular Genetics, GEHU-DDUV, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium) for the genetic cosegregation analyses of the pedigree P4 (II-1, III-2, III-3).

F.B. is supported by E-rare 2011-RARE-013-01 and is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (Investissements d’Avenir). The French registry is supported by grants from Amgen SAS, Chugai SA, GIS Maladies Rares, Institut de Veille Sanitaire, Inserm, and the Center de Référence des Déficits Immunitaires Héritaires (CEREDIH: the French National Reference Center for Primary Immune Deficiencies, www.ceredih.fr).

Authorship

Contribution: M.P., C.B.-C., S.T., B.B., A.P., P.R., C.F., E.V.D.N., H.A.P., T.L., M.O., C.R., G.P., and J.D. provided DNA samples and clinical information; S.T., N.P., O.L., H.A.P., F.B., and E.D. performed the experiments; V.M.-D.M. and J.C. reviewed the blood and BM slides; M.P., S.T., and J.D. reviewed the clinical information; M.P., C.B.-C., S.T., J.D., and E.D. designed the research and analyzed the results; M.P., S.T., J.D., and E.D. produced the tables and figures; and J.D. and E.D. wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Pr Eric Delabesse, Laboratoire d’Hématologie, Pavillon Lefebvre, Hôpital Purpan, Place du Dr Baylac, TSA40031, 31059 Toulouse cedex 9, France; e-mail: delabesse.e@chu-toulouse.fr.

References

- Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:26.
- Donadieu J, Leblanc T, Bader Meunier B, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica*. 2005;90(1):45-53.
- Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia—a review. *Br J Haematol*. 2008;140(2):123-132.
- Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*. 1999;23(2):166-175.
- Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(23):2403-2407.
- Kirwan M, Vulliamy T, Marrone A, et al. Defining the pathogenic role of telomerase mutations in

- myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Hum Mutat*. 2009;30(11):1567-1573.
7. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(10):1012-1017.
 8. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet*. 2011;43(10):929-931.
 9. Böddör C, Renneville A, Smith M, et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica*. 2012;97(6):890-894.
 10. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood*. 2012;119(5):1283-1291.
 11. Holme H, Hossain U, Kirwan M, Walne A, Vulliamy T, Dokal I. Marked genetic heterogeneity in familial myelodysplasia/acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;158(2):242-248.
 12. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood*. 2011;118(10):2656-2658.
 13. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*. 2011;118(10):2653-2655.
 14. Emberger JM, Navarro M, Dejean M, Izarn P. [Deaf-mutism, lymphedema of the lower limbs and hematological abnormalities (acute leukemia, cytopenia) with autosomal dominant transmission.] [Article in French] *J Genet Hum*. 1979;27(3):237-245.
 15. Mansour S, Connell F, Steward C, et al. Emberger syndrome-primary lymphedema with myelodysplasia: report of seven new cases. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(9):2287-2296.
 16. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood*. 2004;103(11):4119-4125.
 17. Doncker AV, Balabanian K, Bellanne-Chantelot C, et al. Two cases of disseminated Mycobacterium avium infection associated with a new immunodeficiency syndrome related to CXCR4 dysfunctions. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):135-139.
 18. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*. 2005;105(6):2449-2457.
 19. Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):2076-2081.
 20. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(4):309-315.
 21. Minelli A, Maserati E, Giudici G, et al. Familial partial monosomy 7 and myelodysplasia: different parental origin of the monosomy 7 suggests action of a mutator gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;124(2):147-151.
 22. Balabanian K, Levoye A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1074-1084.
 23. Balabanian K, Brotin E, Bjaajoux V, et al. Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood*. 2012;119(24):5722-5730.
 24. Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med*. 2012;209(3):565-580.

Article 2, Analyse clinique, en préparation

GATA2 deficiency, beyond hematological and immune defects: a report of 81 patients from the French Chronic Neutropenia Registry

Marlène Pasquet; Marie Lamant, Aurélie Caye-Eude, Flore Sicre de Fontbrune, Blandine Beaupain, Claire Fieschi; Marie Ouachee; Hélène Poirel, Jacinta Bustamante; Bertrand Isidor, Alexandre Neel, Françoise Bachelerie; Anna Maciejewski-duval; François Delhommeau; Jean-Hugues Dalle; Stanislas Nimubona; Eric Jeziorski; Caroline Thomas; Arnaud Petit ; Marion Strullu ; Vincent Barlogis ; Thierry Leblanc; Sarah Beaussant-Cohen ; Pierre Rohrllich; Thierry Lamy; Stéphane Vignes; Felipe Suarez; Laurence Faivre ; Anne Sophie Brunel ; Dana Ranta, Abouchahla Wadih; Louis Terriou; Oana Balasanu; Bernard Drenou ; Viviana Marin-Esteban ; B. Boistard ; Bruno Lioure ; J Gutnecht ; F. Monpoux; F. Chabot ; Ahle Guido ; Claude Preudhomme, Eric Delabesse ; Hélène Cavé ; Christine Bellanné Chantelot; Jean Donadieu

GATA2 deficiency, beyond hematological and immune defects: a report of 78 patients from the French Chronic Neutropenia Registry

Marlène Pasquet^{1,2}, Marie Lamant¹, Aurélie Caye-Eude, Flore Sicre de Fontbrune, Blandine Beaupain, Claire Fieschi; Marie Ouachee; Hélène Poirel, Jacinta Bustamante; Bertrand Isidor, Alexandre Neel, Françoise Bachelerie; Anna Maciejewski-duval; François Delhommeau ; Jean-Hugues Dalle; Stanislas Nimubona; Eric Jeziorski; Caroline Thomas; Arnaud Petit ; Marion Strullu ; Vincent Barlogis ; Thierry Leblanc; Sarah Beaussant-Cohen ; Pierre Rohrllich; Thierry Lamy; Stéphane Vignes; Felipe Suarez; Laurence Faivre ; Anne Sophie Brunel ; Dana Ranta, Abouchahla Wadih; Louis Terriou; Oana Balasanu; Bernard Drenou ; Viviana Marin-Esteban ; B. Boistard ; Bruno Lioure ; J Gutnecht ; F. Monpoux; F. Chabot ; Ahle Guido ; Claude Preudhomme, Eric Delabesse ; Hélène Cavé ; Christine Bellanné Chantelot⁴ ; Jean Donadieu^{3,4}

CBC : Department of Genetics, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France and Gustave Roussy, INSERM, UMR 1170, , Villejuif, France

CBC and JD contributed equally to this study

Corresponding authors

Dr Marlene Pasquet

Dr Jean Donadieu

Article type: Original report

Running title: GATA2 French Registry

Word count for text: (max 4000); Word count for abstract: (max 250); Figure/Table count: (max 7); Reference count: (max 100)

Key words: GATA2, leukemia, myelodysplasia, immunodeficiency, genetic counseling.

Abstract

Germline *GATA2* mutations are known to be a strong leukemia predisposition syndrome as well as the cause of other cellular deficiencies. We described a cohort of 78 patients with germline *GATA2* mutation registered from the French National Chronic Neutropenia Registry, established in 1993. Median age at first clinical symptoms was 17.8 years (0 to 61 years). Severe bacterial and mycobacterial infections, warts and hematological malignancies were the most common first symptoms, 88% of the patients being symptomatic by the age of 40. We highlighted new clinical features in *GATA2* spectrum with 1 acute lymphoid leukemia (ALL), one Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), a progressive and fatal multifocal leuco-encephalopathy related to JC virus, and auto-immune sarcoidosis-like syndromes. IPSS-revised score allowed classification between stable disease and hematological transformation. As mortality remained high in our cohort up to 35% by the age of 40 years, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) remained the therapeutic of choice in case of infectious complications and clonal evolution. Classical chemotherapy should be limited, due to toxic infectious complications. The timing of HSCT remains hard to determine but the earlier it was performed, the better the outcome was. This large cohort showed no genotype/phenotype correlation.

Introduction

Germline heterozygous mutations in the hematopoietic transcription factor *GATA2* have been reported since 2011 to be the cause of a disease with several faces: familial myelodysplasia (MDS) or myeloid leukemia (AML)¹, monocytopenia mycobacterial infections /dendritic cell, monocyte, B and NK deficiency (MonoMAC/DMLC)^{2, 3} and Emberger syndrome (primary lymphedema with MDS)⁴. *GATA2* is a transcription factor involved in early hematopoiesis and germline mutations predisposed to familial MDS and/or AML, as *RUNX1* and *CEBPA*^{5,6}. Initial screening of our French Chronic Neutropenia Registry identified 14 patients with neutropenia, then patients with aplastic anemia, pulmonary proteinosis, dermatologic, autoimmune and vascular features were described in other cohorts⁷⁻¹⁰. The unification of so many phenotypes under one gene shows the complex regulation linked to this transcription factor and suggests that more phenotypes might rise up.

The *GATA2* mutational spectrum is highly heterogeneous with no mutational hotspot. Most of molecular defects are distinct mutations including amino acid substitutions located within the highly conserved C-terminal zinc finger (ZF) domain, truncating mutations spread out the entire coding region regulatory mutations in a +9.5kb regulatory region and more rarely whole gene deletion¹¹. No correlation between the type or location of the *GATA2* mutation and the clinical expression (except for lymphedema with nonsense and deletion mutation) has been established^{7,9,10}.

So far, 158 patients with *GATA2* germline mutations were reported in 4 surveys⁷⁻¹⁰ while several case reports have been issued until recently for a total of less than two hundred cases known worldwide. As the size of the surveys reported so far remained limited, or biased by the criteria used for recruitment, we set up a large multicenter study to catch the different faces of the disease, we reported here 78 patients with germline *GATA2* mutations and belonging to 52 pedigrees. We aimed to assess the initial manifestations, the evolution of biological parameters with regards to age, and to define the outcome of each patient, with regards to the onset of severe manifestations (leukemia, mycobacterial and severe viral infections, vascular defects). Our wide cohort allowed to extend the clinical spectrum associated with *GATA2* defects and to characterize the clinical variability and penetrance associated with *GATA2*-related disorder. Lastly, we collected data about the management care, which still remain a matter of debate as far as bone marrow transplant is considered.

Patients

Patients were registered in the French Severe Chronic Neutropenia Registry, established in 1993. The registry has been recognized as a national registry by the French health authorities since 2008, and its completeness has been verified against multiple separate sources, using previously reported methodology¹²⁻¹⁴. The database was approved by the French computer watchdog commission (CNIL certificate n° 97.075). Patient files are monitored by clinical research associate. This registry was primarily established to enroll in France all patients with chronic neutropenia. By extension, all patients identified with a given genetic disease (*GATA2* for example) occasionally associated with a chronic neutropenia can be enrolled in our registry. With regards to *GATA2* mutations, we systemically seek for additional sources of enrolment, according to previous publications. Indeed, *GATA2* mutations were observed in a larger network than the hematological units and additional sources were internal medicine, infection disease and genetic units as well as adult HSCT units.

Genetic Analyses

The patient, or their parents if they were minor, gave their written informed consent for genetic testing and participation to the study. Genomic DNA was extracted from blood with standard procedures. Genetic analyses were performed in two steps: 1. the search for sequence variants of exons 2 to 6 and intron 4 of the *GATA2* gene (NM_032631.4) by Sanger sequencing as previously described⁸ or by targeted next-generation sequencing using a capture approach (NimbleGen SeqCap EZ Library) followed by sequencing on a MiSeq system (Illumina); 2. In the absence of pathogenic *GATA2* mutations, the search for large genomic deletions of *GATA2* by multiplex quantitative PCR, MLPA dosage (MRC Holland) or array CGH (comparative genomic hybridization).

In case of sporadic cases, the germline character of the identified variant was assessed by analyzing a non-hematopoietic tissue (cultured primary skin fibroblasts, hair follicles or nails). Interpretation of variants was assessed according to current guidelines¹⁵. Truncating mutations (nonsense, frameshift, multi-exon deletion) were considered as disease-causing. Pathogenicity of missense and splice-site variants not affecting canonical ± 1 and 2 splice sites was based on the following criteria: functional studies supportive of a damaging effect, mutation not present in the general population database (Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser (<http://exac.broadinstitute.org>)); mutation previously reported in *GATA2*-deficiency; *de novo* occurrence, familial cosegregation analysis and predictive algorithms of pathogenicity for

missense mutations (SIFT, Align GVGD, PolyPhen-2 and Combined Annotation-Dependent Depletion score, CADD) and for splice-site defects (MaxEntScan and Human Splicing Finder)¹⁵. The predictive algorithms, except CADD, were run with the Alamut Visual version 2.7 software (Interactive Biosoftware, Rouen, France).

Clinical investigation

Demographic, hematological parameters, liver tests, immunological tests and infectious status were recorded. Septicemia, cellulitis, pneumonia, osteitis, and liver abscess were considered as severe infections and were systemically recorded as well as germs responsible of each episode. Profuse skin or genito-anal warts were considered as specific event. Mycobacterial infections were considered if a mycobacteria was identified in a pathological tissue. Suspected mycobacteria was considered if the tissue sample was compatible with the diagnosis of mycobacteria, not sensible to anti-bacterial or anti-fungal therapy but sensible only to mycobacterial antibiotherapy. Immunoglobulin levels were analyzed according to age¹⁶. Age at first symptom was defined by the age at the first clinical pathological manifestation among the following list: myelodysplasia or acute leukemia, any severe and potentially life threatening infection including severe viral or mycobacterial or invasive mycotic infections or severe bacterial infections, lymphedema, pulmonary proteinosis, profuse HPV infections. At contrary a patient was considered as free of symptoms if he was free of all any clinical manifestations mentioned above till the last follow up visit. If genetic test couldn't be available for all members of a family, siblings or parents have been considered to be carried *GATA2* mutations if they presented typical manifestations of *GATA2* complex. Such information should have been ascertained by a written medical report otherwise considered as suspected case.

Definition of hematological features and hematological complications

Full blood count (FBC) were analyzed after classification in 4 periods: baseline or period with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) therapy or any period following hematological complications like MDS or AML or period after hematopoietic stem cell transplantation.

The classification of hematological complications was based on three criteria: bone marrow morphology, differential count, and cytogenetics. Bone marrow smears were classified according to the 2008 WHO classification, which is applicable to define acute leukemia and myelodysplastic syndrome (MDS)^{17, 18}. Myelodysplastic features were ranked according to revised version of the International Prognostic Scoring System¹⁹.

Statistical methods

Stata® software version 13 was used for all statistical analyses. Lower and upper interquartile and median values depicted the distribution of quantitative variables. Differences between groups of patients were analyzed using Fisher's exact test if the event was discrete and Wilcoxon's test for quantitative variables. Survival was compared between groups of subjects using the log-rank test, and Cox model was used for multivariate analysis²⁰. As we performed repeated tests, *P* values <0.001 were considered to indicate statistical significance, unless otherwise stated. For survival analyses the endpoints were death, MDS or acute leukemia (AL) and the period taken into account was the interval from birth to the event or to the last examination when no event occurred.

We have also analyzed the survival after the onset of a clonal event. The period taken into account was the interval from first clonal event (myelodysplasia or acute leukemia) to death or to the last examination when no event occurred.

The Kaplan-Meier method was used to estimate survival rates. The cut-off date was September 30th, 2016.

Results**Demography and initial symptoms**

We identified 78 patients (39 males and 39 females) with germline *GATA2* mutations from 52 pedigrees (table 1 and 2 for a summary of symptoms), 14 of them have been described previously⁸. They were enrolled from France (n=71) and Belgium (n=7) in a total of 34 units. Median age at last follow up (FU) was 24.5 years (range 3.9 -73 years) for a total of 2210 years/persons. Five patients (all relatives from a family with symptomatic patients bearing *GATA2* mutation) were asymptomatic at last FU with a median age of 13 years. Only one asymptomatic patient is oldest than 16 years, and he is aged of 60 years old. Noteworthy, the mean hematological parameters of these asymptomatic patients remained in the normal range until last FU: hemoglobin (Hb) 12.8 g/dl, mean corpuscular volume (MCV) 87 fl, platelets 175 x 10⁹/l, white blood cells (WBC) 6.4 x 10⁹/l, absolute neutrophil count (ANC) 2.6 x 10⁹/l, lymphocytes 1.9 x 10⁹/l and monocytes 0.48 x 10⁹/l. The sole abnormalities presented by the oldest patient, father of 3 children with symptomatic disease, and brother of patients, is mild macrocytosis (MCV 98 fl) while his bone marrow cytogenetic is bearing a 9ph+ chromosome.

Among the 73 symptomatic patients, the first clinical manifestations were: severe bacterial infections in 17 patients (22.3%), hematological malignancy in 19 patients (25.6%), profuse warts or HPV in 15 (20.2%), mycobacterial infection in 6 (8.1%), lymphedema in 6 (8.1%),

erythema nodosum/panniculitis in 4 (5.4%), mild cytopenia in 3 (4.1%), mental retardation in one, a transient ischemic cerebral palsy in one and multifocal progressive leukoencephalopathy in one. Median age at first clinical symptoms for these 73 patients was 17.8 years (min 0- max 61 years). The onset of the disease is depicted in Figure 1. The probability to remain free of symptoms was 38.5% (95% CI 25%-50%) by 20 years and 12.4% (95%CI : 5% -21%) by 40 years.

Hematologic and Immunologic features at baseline

Among the 59 patients free of malignancy at onset, a complete blood count was available in 49 before any further hematological complications. In such cases, FBC was frequently abnormal: 19 (39%) had neutropenia $< 1.5 \times 10^9/l$, 24 (49%) monocytopenia $< 0.1 \times 10^9/l$, only 5 (10.2%) anemia < 9 gr/dl, 7 (14%) macrocytosis (MCV > 100 fl), and 9 (18%) had platelets below $100 \times 10^9/l$, reflecting the rarity of initial anemia and/or thrombocytopenia. Overall only 13 out 49 evaluable patients (26%) had a normal CBC at their first examination and conversely, 74% presented at least one hematological abnormality, while they were free of malignancy. Considering blood samples at baseline plotted according to age, monocytopenia was the most common feature, while other values, even low, showed a large inter-patients variability (supplemental Figure 1). Immunological testing also varied with time in a given patient. Within the 38 patients with valuable data, T cells were relatively preserved with a median value of $0.969 \times 10^9/l$ T CD3 (range 0.1-7.5), $0.367 \times 10^9/l$ T CD4 (range 0.052-5.6) and $0.486 \times 10^9/l$ T CD8 (range 0.015-2.328). B cells appeared constantly low with a median value of $0.02 \times 10^9/l$ (range 0-1.51) and NK cells (CD 16) were relatively well preserved with a median value of 0.12 (range 0-0.338). Immunoglobulin levels were in a normal range: median IgG rate = 9.3 g/l (range 4 - 40) IgA=0.9g/l (0.33-3.4), IgM=1 g/l (range 0.05 - 2.4).

Despite the mild apparent dysfunction extended immunophenotyping of their whole blood lymphocyte populations, a more extended phenotype²¹ show additional information as 3 patients displayed natural killer cell cytopenia while the CD56bright natural killer subpopulation was nearly absent in all 7 patients.

Hematological malignancies

Among the 78 patients, 63 presented with hematological transformation, MDS and AML being the main clinical features. The risk of developing MDS/acute leukemia rapidly increased from 6.7% by age of 10 years, 39.8% by 20 years of age, to 79.3% by age 40 years (Figure 1). The first hematological manifestation of the disease was a hematological malignancy in 19 patients including 1 juvenile myelo monocytic leukemia, a myelodysplasia in 14 patients and acute

leukemia in 4. Among the 63 patients with hematological malignancies, the initial diagnosis was a MDS in 55, an acute leukemia in 6 patients and a chronic leukemia in 2. Among the 55 patients diagnosed with a MDS, acute leukemia was later observed in 9 patients. The morphological aspect of leukemia was mainly myeloid but an acute lymphocytic leukemia (ALL) was observed in 1 patient (T ALL with a monosomy 7).

In addition to such hematological complications which appeared mainly in adulthood, one neonate has presented a juvenile myelo monocytic leukemia (JMML) with persisting chronic abnormalities by age of 4 years old, without acutisation. In addition, 2 patients were diagnosed with a transient aplastic anemia, with a spontaneous recovery 3 months after the onset and 2 patients was followed for a chronic thrombocytopenia, without evidence of myelodysplasia or cytogenetic abnormalities.

Bone marrow cytogenetics analyses were studied and evaluable in 65 patients. It was normal for 23 cases (35%) and abnormal in 42 (65%), with monosomy 7 in 18 cases, 7q or 7p deletion in 4, trisomy 8 in 12 cases (and both monosomy 7 and trisomy 8 in 4 cases), other cytogenetics abnormalities in 4 cases and a complex karyotype in 4 cases.

Infectious

A wide variety of infections linked to defective mediated immunity were observed, comprising most of the time severe bacterial pneumonitis and colitis, herpes virus, mycobacterial and fungal infections.

Severe bacterial infections were the first feature of the disease in 23% of the cases, and occurred life-long in 44 cases (56%) and interestingly before a clonal event in 23 patients. Pulmonary infections were frequent (in about 2/3 of the cases) and, although they favorably evolved with classical antibiotic treatments, several recurrences might happen. 12 patients presented non-tuberculosis mycobacterial (NTM) infection (Figure 1 and 2) (*Mycobacterium avium*, *M. Kansasii*, *M. Chelonae*, *M. Genavense*), and 4 patients had a tuberculosis. Atypical mycobacterial and tuberculosis was diagnosed at the same time with myelodysplasia in 7 cases. The risk of mycobacterial infections is plotted on Figure 1 and is roughly parallel to the risk of leukemia.

Aspergillosis was observed in 11 cases and other fungal infections in 7 (candidiasis and mucormycosis). Noteworthy, 5 out the 11 aspergillosis and 3 out 7 candidiasis and mucormycosis were diagnosed on chemotherapy regimen.

Of note, severe viral infections were the cause of death in 4 patients: H1N1 influenza infection 5 years after AML treatment (P36) (Figure 2), EBV lymphoproliferative disease after transplant (P12), HPV-related vulvar metastatic carcinoma (P43). One patient (P35) had a first presentation

at age of 38 years old with a progressive multifocal leukoencephalopathy due to JC virus. He presented a cerebellar syndrome and facial paralysis, progressively went into a coma and died one year after the first symptoms. FBC revealed a B-cell lymphopenia and megakaryocytic dystrophy was found in the bone marrow.

Cutaneous or genital recurrent HPV-induced warts were frequently observed (30 cases, 38%) and were often the first symptoms reported. High resistance to local treatment and several recurrences were main features. Of note, one patient (P42) developed first HPV genital condyloma at 19 years and multiple recurrences until a cervical intraepithelial neoplasia grade 2, associated to multiples ENT infections and pulmonary aspergillosis. She finally developed a MDS at 25 years old and underwent HSCT but still presented HPV related troubles with high risk genital dysplasia after transplantation. Another woman (P43) had numerous genital HPV-induced warts since age of 14 years, evolving to lethal carcinoma.

Bacterial and viral common infections were also often noticed: 9 bacterial skin and soft tissues infections, 5 ENT and stomatologic infections, 1 mucocutaneous candidiasis, 2 EBV positive patients (one with viremia before any immunosuppressive therapy, the other one had a chronic active EBV infection post HSCT). As interesting feature, the course of 6 cases (2 mycobacterial, 1 fungal and 3 viral infections) was complicated by hemophagocytic syndrome (Figure 2).

Neoplasia

A solid tumor was found in 6 patients. Three women had HPV related cancer (P2, P42, P43), lethal in one case. In addition, one woman developed breast cancer at 63 years old (P37) and one developed an adrenal Conn adenoma (P25) and lastly a patient developed a metastatic adenoma, without identification of the primitive tumor (P6). Moreover one patient had an epidermoid carcinoma.

Auto immunity and inflammatory disease:

In 9 patients, unexpected autoimmune manifestations were observed at diagnosis, with panniculitis, vascularitis, Sweet syndrome, lupus-like or sarcoidosis-like syndromes. Auto-immune markers were present in 12 patients but they were inconstantly sought.

Associated co-morbidities

Three patients had pulmonary alveolar proteinosis (PAP). Chronic lymphedema was noted in 11 patients (14.1%) (Figure 2). Vascular and /or Thrombotic complications were also observed in seven patients. Two patients presented a transient cerebral palsy with a negative work up, suggesting a minor thrombotic vascular cerebral thrombosis (P16, P28). One (P48) had a splenic

vein thrombosis after a splenectomy in the context of disseminated mycobacteriosis and Macrophage activation syndrome. Another one (P42), presented three deep veins thrombosis and a T ALL. Patient P37 (mother) developed deep vein thrombosis and pulmonary embolism while treatment for breast cancer and MDS. Factor V Leiden mutation was observed in one family (Pedigree 46). One of them suffered from a pulmonary embolism after pneumonia. One patient (P43) presented a myocardial infarction at age of 40 years, without any other risk factor. And finally one patient died from aortic dissection at age of 33 years.

Deafness was observed only in 1 patient with congenital malformations. Three patients had presented urogenital abnormalities.

Three patients were premature, two women suffered a miscarriage, and one patient had an hypothyroidism.

Survival and Treatment

In our cohort, 26 patients died from hematological or immunological complications at a median age of 28.6 years (min 10.2 years - max 72.6 years). Myelodysplasia or leukemia was the main cause of death in 14 patients, in 7 cases after chemotherapy, whatever the regimen was and in 7 cases after HSCT. Infectious complications leading to a fatal issue were disseminated mycobacterial infection in 3 patients, bacterial infections in 3 and severe viral infections in 4 (JC virus encephalitis, HPV infection with oncogenic development, H1N1 flu and EBV lymphoproliferative disease secondary to an HSCT). 1 patient died further to an aortic dissection and another one because of a metastatic carcinoma. Survival analyses showed a poor outcome related to *GATA2* mutated patients: although mortality was limited in the first decades, it rapidly increased to reach 6% by the age of 20 years, to 42% by the age of 40, and finally 69.4% at 60 years (Figure 3). Survival after a clonal event (MDS and/or leukemia) was 60% by the age of 40 years (Figure 3). 27 patients underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) for MDS or acute leukemia and/or immune deficiency. The overall survival after transplant was 72% after 1 year and 60% after 5 years and appeared later to achieve a plateau. Toxicity related mortality appeared to be quite high. 9 patients died after HSCT due to severe infections or graft versus host disease. Survival after HSCT appeared also to depend on the age of transplantation (Figure 3): the earlier the HSCT was realized the better the outcome was, probably due to age-related fragility and numerous co-morbidities, but is also related to the indications, acute leukemia or high IPSS score being a risk factor for poor outcome.

The natural history of hematological malignancy in patients with *GATA2* mutations appeared to be difficult to describe in a retrospective observational survey. Despite such weakness, striking observations could be drawn from our large study. First, in case of frank leukemia (n=17), an

aggressive chemotherapy induction regimen was proposed in 15 patients, with primary failure in 11, and a severe infectious toxicity in 9 cases (6 aspergillus or severe fungal infections). Demethylating agent (5 azacytidine) with a long term disease control was used for 3 patients, and could be an option for these patients.

In order to use a well known scoring system, we apply the IPSS retrospectively, if a precise description of the bone marrow, the complete blood count and the cytogenetic was available at different time point of the follow up of the patients. Among the 63 patients with a malignant hematological complication, we applied the IPPSS Revised scoring system in 47 patients at diagnosis. The distribution of the score show a predominance of medium score (IPSS-R 1.5 - 4.5) with 25 patients (53%), 12 patients (25%) had a low grade score (<1.5), and a small group of 10 patients (21%) had a high score (>4.5 or Acute leukemia) while the age of the patients was not significantly different between group of score. Subsequently, 5-year survival can be divided into 3 groups according to the IPSS-R score : 30% for the high risk group, 80% in the medium risk group and 100% in the low risk group ($p < 0.001$) (Figure 3).

Mutational spectrum of *GATA2*

Among the 52 probands, 3 had a whole heterozygous *GATA2* deletion, and the others had heterozygous sequence variants including 1 intronic variant located in the regulatory element of intron 4, 21 truncating mutations (10 nonsense and 11 frameshift mutations), two splice defects, one in frame-duplication and 24 missense mutations (Table 1). Only mutations predicted likely pathogenic or pathogenic based on current guidelines (see Methods)¹⁵ were considered in this study. Forty-two (80.7%) of them were distinct sequence variants and among which 26 (61.9%) were novel mutations (Table 1). All missense mutations and 62% (13/21) of truncating mutations were located within the first or second zinc finger domains. The germline status of the *GATA2* mutations was confirmed in 30 probands by analyzing a non-hematopoietic tissue. The other 22 mutations were highly suspected to be germline as the variant allele frequency was closed to 50% and there was no clinical symptom suggestive of a *GATA2* deficiency in first and second – degree relatives of probands. Familial cosegregation was analyzed in 28 pedigrees. In five of them, the *GATA2* mutation occurred de novo. Seventeen had an autosomal dominant inheritance and in the 6 others, we could only exclude the presence of the *GATA2* mutation in one parent, the other being unavailable.

No genotype phenotype correlation could have been highlighted in our cohort, considering the type of mutation (missense vs. truncating mutations) and the risk of severe bacterial infections, the risk of leukemia or MDS and the survival. Comparison of median age at diagnosis between the probands and their relatives revealed no significant difference. However, in some families,

penetrance was incomplete regarding to the age of first symptoms, the clinical manifestations and the existence of asymptomatic carriers (P2, P45 P46, table 1).

Discussion

Five years after the identification of germline *GATA2* mutations and our initial publication based on patients with mild chronic neutropenia⁸, we reported here a large national based cohort of 78 patients. We have extended the identification of patients with *GATA2* mutations while systemically sought for patients with additional manifestations in hematological, infectious and internal medicine units, with both adult and pediatric enrollment. Thus, we described a complete picture of clinical phenotype with limited biases and highlighted new presentations, in addition to those described in the three previous surveys^{7,9,10}.

In our experience, disease presentation is usually limited to quite common bacterial infections in the first decade and even lymphedema appears latter on. At an early pediatric age, the chance to make a diagnosis is restricted to the existence of a familial history. Then, during the second decade, patients may present one of the faces of the disease: infection, inflammation or hematological transformation. In the absence of MDS/AML, infection or inflammation may be suggestive of *GATA2* deficiency if they are associated with one of the most frequent blood abnormalities (mild chronic neutropenia, monocytopenia, or macrocytosis), and/or warts or lymphedema. Severe bacterial infections are quite frequent at diagnosis (roughly half of the patients), and prior to a clonal event in most of the cases. Considering the relative mild neutropenia, it suggests, together with monocytopenia, that additional abnormalities in neutrophils migration like in WHIM syndrome²¹ may explain the unusual frequency of these infections. Although cytopenias are highly prevalent, and up to 2/3 of the patients as a first biological sign, thrombocytopenia and anemia are a less frequent first presentation in our cohort, and monocytosis could also be noticed, especially in patients with MDS, confirming a recent report¹⁰. Indeed, while *GATA1* regulates erythropoiesis and megacaryopoiesis^{22,23}, *GATA2* is mainly involved in the regulation of critical genes in hematopoietic stem cells and progenitors, and its expression should be down-regulated to allow terminal erythroid differentiation^{24,25}.

New presentations were of particular interest in our survey. First, the observation of auto-immune complications such as lupus or sarcoidosis-like disease, Sweet syndrome and panniculitis in our cohort is of interest as *GATA2* deficiency was not initially associated with such features. Sarcoidosis and sarcoidosis-like syndromes could be the initial presentations in *GATA2* patients and should raise rheumatologist's attention. There is increasing evidence from the literature than this condition may be associated with wide and often poorly-characterized auto-immune

manifestations disease, especially dermatological ones (panniculitis, erythema nodosum), but also vasculitis-like skin lesions, lupus-like, and more recently auto-immune hepatitis²⁶⁻³⁰.

Dermatologists and gynecologists should also be aware of patients with multiple cutaneous and genital warts at presentation, who represent up to half of the patients in our cohort. Severe, recurrent, and life-threatening oncogenic HPV lesions, led us to consider an early HPV vaccination in childhood, like in Whim syndrome³¹. Interestingly, one of our patients kept developing HPV condylomas after HSCT raising the question of HPV genome persistence in epithelial cells despite correction of immunodeficiency.

Susceptibility to severe viral infection is a key feature in GATA2 deficiency^{7, 9, 10} and was responsible for a fatal issue in 4 patients. Of note, one patient died from a progressive multifocal leukoencephalopathy due to JC virus, and severe viral infections in young adults with no past history, as seen in HIV/AIDS, should raised the question of an underlying immune deficiency affecting innate immunity (NK cells and neutropenia), one of which is GATA2⁸.

Compared to the largest cohort in terms of clinical picture⁹ we identified fewer cases with skin and breast cancer, pulmonary alveolar proteinosis and pulmonary dysfunction, sensorineural hearing loss, miscarriage and hypothyroidism. Some biases linked to the retrospective analysis of patients followed during years before diagnosis could explain these underrepresented features. However, we believed that the relationship between GATA2 deficiency and non hematological cancers is less clear, notably we were not able to confirm the unexpected high frequency of breast cancer in the NIH cohort⁹. Systematic explorations would probably highlight higher rates of clinical features.

Our study confirmed that hematological complications are a major issue in GATA2 patients, 60% of the patients developed MDS and/or AML during the follow-up. Interestingly, one patient presented with ALL, as it was also reported in a recent case³². The observation of acute lymphoblastic leukemia complicating clinical course of GATA2-mutated patients led us to expand our search fields. GATA2 factor is crucial for hematopoietic stem cell and progenitors self-renewal and differentiation^{33, 34}, but also in B and T cell development *in vitro* and more recently in a low-level GATA2 over expression model in mice^{34, 35}. In this model, lymphoid block was distal to the common lymphoid progenitor in mice.

Patients' outcome appeared to be very difficult with a high rate of mortality (35% at 40 years up to 72% at 60 years), and it seems that treating an advanced MDS or AML is coming too late. The follow-up of this cohort showed that the present strategy, with regards to mortality, is poor, mainly because the classical strategy of chemotherapy and/or HSCT is hampered by very high rates of failure and toxicity. As a matter of concrete improvement, we proposed a distinction between chronic disease and evolution toward leukemia based on the IPSS revised score. This

score appeared more accurate than the WHO classification, with cytogenetic abnormalities as a major criteria, to propose a specific therapy for each individual¹⁹. Moreover, somatic mutations have now been described as a trigger of leukemic transformation in GATA2-mutated patients, with *ASXL1* mutations being implicated in first reports^{36, 37}. More recently, other mutations in the RAS pathway (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*), in AML/MDS “common” genes (*RUNX1*, *STAG2*, *IDH2*, *TP53*, and *SETBP1*) have also been reported in GATA2 families with leukemic transformation^{36, 38} and personal communication. We recommend an initial screening and a sequential follow-up of these somatic mutations to have a better understanding of molecular events leading to leukemia in GATA2 patients and to accelerate the timing of HSCT. Importantly, our study showed that the earlier in life the HSCT is performed the better the outcome is and that chemotherapy could be toxic and ineffective in this case. The question of timing of pre-emptive transplantation is still pending but improved OS in patients with refractory cytopenia suggest that early HSCT is a reasonable approach (Sicre et al, manuscript in preparation).

Beyond the marked clinical heterogeneity of this disease, we also mentioned five asymptomatic cases with normal FBC, only one of them was an adult aged 60 years old at the last follow-up and related to a large pedigree with several affected family members presenting MDS, the other asymptomatic GATA2 carriers being of pediatric age. Such situation appears exceptional and reflects the incomplete penetrance previously reported in a few individuals^{7, 10}. As in other series, our results confirmed the allelic heterogeneity of GATA2 mutational spectrum. About 60% of mutations identified in this study have not been previously described. Our results did not highlight correlations between the hematological complications, the main issue of GATA2-related disorder, and the type and the location of mutations. This highly suggests that GATA2 itself is not sufficient to promote leukemogenesis and cooperation with acquired mutations is required to promote the development of MDS or AML. The additional and novel phenotypes identified in this study were not associated with specific molecular defects.

The clinical and biological spectrum of our cohort is necessarily limited by the retrospective analysis. However, this multicenter study based on a registry was an unique opportunity to describe a complete clinical picture of GATA2 deficiency without referral biases. It is of clear evidence that GATA2 is a severe disorder that unites immunodeficiency, hematological malignancy, pulmonary, dermatologic and vascular disease. Our pathophysiologic understanding of GATA2 deficiency has evolved : the heterogeneity of the GATA2 syndrome come not only from clinical defects but also from biological distinct ones : collaborative work showed that the R204X mutant acting as a loss of function mutation in contrast to the R396Q mutant associated with new protein properties (pasquet et al, blood, submitted).

Aknowledgments

The authors are thankful to the patients and families for their participations in this study. They are also thankful to all the French and Belgium centers which participated to the Registry and helped to collect the data.

Authorship contributions

ACE, FSF, BB, CF, MO, HP, JB, BI, AN, FB, AMD, FD, JHD, SN, EJ, CT, AP, MS, VB, TL, SBC, PR, TL, SV, FS, LF, ASB, DR, AW, LT, OB, BD, VME, BB, BL, JG, FM, FC, AG, CP, ED, HC, CBC provide biological and clinical information. CBC reviewed genetic information. MP and JD reviewed clinical information. MP, ML, CBC and JD designed the research and analysed results. MP, ML, CBC and JD wrote the paper.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

Legends

Figure 1. Onset of disease, hematological and infectious complications, Survival. Kaplan-Meier curves are shown for onset of disease in 78 symptomatic *GATA2* mutated patients; *GATA2* mutated patients had a rapid evolution towards Myelodysplasia or Acute Leukemia. Risk of mycobacterial, HPV, severe bacterial and mycotic infection life-long. Confidence intervals of 95% are shaded in light gray.

Figure 2. Clinical, radiographic and cytological features of GATA 2 deficiency. (A) Hand cutaneous warts in a young man with MDS (P7) (B) Bilateral lymphedema post-HSCT (P51) (C) Acute Respiratory Distress Syndrome in H1N1 infection (P36) (D) Osteomyelitis at presentation of the disease (P11) (E) Pulmonary alveolar proteinosis in a young woman with MDS and warts (P28) (F) Disseminated Mycobacteriosis with pulmonary nodules (P42) (G-H) Bone marrow smears of pedigree 46: (G) Dysgranulopoiesis and blasts in a 36 years old woman with MDS evolving to ALM2 (P46 mother) (H) Dyserythropoiesis and dysgranulopoiesis in a 16 years old boy who developed a MDS (P46*) (I) Macrophage activation secondary to severe flu infection (P40).

Figure 3. Survival, IPSS and transplantation of the 78 patients. Kaplan Meier curves showing overall survival of the whole cohort and after the diagnosis of MDS and/or acute leukemia. OS was detailed according to IPSS revised score and after HSCT depending on the age of transplantation (before 18 years old, between 18 and 35 years old and after 35 years old). MDS features were ranked according to revised version of the International Prognostic Scoring System¹⁹ in 3 groups : low score <1,5, intermediate score 1,5 to 4,5 and high score >4,5. Confidence intervals of 95% are shaded in gray

Supplemental Figure 1. Blood counts and Immunological testing in 49 patients. Box plot of the median hematological counts sorted by aged categories. Absolute neutrophil, lymphocyte, monocyte counts (cells/mm³), hemoglobin (g/dl), platelets (G/l).

Table 1. Clinical and biological presentation of 78 patients with *GATA2* mutations.

Table 2. Summary of clinical and biological presentation of GATA2 mutated patients

Reference List

1. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011;43(10):1012-1017.
2. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* 2011;118(10):2656-2658.
3. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* 2013;121(19):3830-3837.
4. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* 2011;43(10):929-931.
5. Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE, Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults. *Ther Adv Hematol* 2013;4(4):254-269.
6. Tawana K, Wang J, Renneville A et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood* 2015;126(10):1214-1223.
7. Dickinson RE, Milne P, Jardine L et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood* 2014;123(6):863-874.
8. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(5):822-829.
9. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* 2014;123(6):809-821.
10. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V et al. Prevalence, clinical characteristics and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes (MDS) in children and adolescents. *Blood* 2015.
11. Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol* 2015;169(2):173-187.
12. Donadieu J, Leblanc T, Bader MB et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica* 2005;90(1):45-53.
13. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B et al. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica* 2012;97(9):1312-1319.
14. Donadieu J, Beaupain B, Mahlaoui N, Bellanne-Chantelot C. Epidemiology of congenital neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013;27(1):1-17.
15. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-424.

16. Plebani A, Ugazio AG, Avanzini MA et al. Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts. *Eur J Pediatr* 1989;149:164-167.
17. Arber DA, Brunning RD, Orazi A et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SHCEHNLJESPSASHTJVJW, editor. 4 th ed. WHO; 2008:124-126.
18. Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol* 2008;45(1):60-70.
19. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454-2465.
20. Collet D. Modelling survival data in medical research. London: Chapman and Hall; 1994.
21. Maciejewski-Duval A, Meuris F, Bignon A et al. Altered chemotactic response to CXCL12 in patients carrying GATA2 mutations. *J Leukoc Biol* 2015.
22. Orkin SH, Zon LI. Genetics of erythropoiesis: induced mutations in mice and zebrafish. *Annu Rev Genet* 1997;31:33-60.
23. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* 1997;16(13):3965-3973.
24. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem* 2010;285(41):31087-31093.
25. Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson KD, Perkins AS. Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res* 2012;40(13):5819-5831.
26. Bigley V, Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2011;96(8):1081-1083.
27. Ishida H, Imai K, Honma K et al. GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr* 2012;171(8):1273-1276.
28. Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2012;122(10):3692-3704.
29. Vinh DC, Patel SY, Uzel G et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 2010;115(8):1519-1529.
30. Webb G, Chen YY, Li KK et al. Single-gene association between GATA-2 and autoimmune hepatitis: A novel genetic insight highlighting immunologic pathways to disease. *J Hepatol* 2016;64(5):1190-1193.
31. Beaussant CS, Fenneteau O, Plouvier E et al. Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7(1):71.
32. Koegel AK, Hofmann I, Moffitt K, Degar B, Duncan C, Tubman VN. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with MonoMAC syndrome/GATA2 haploinsufficiency. *Pediatr Blood Cancer* 2016.

33. Rodrigues NP, Tipping AJ, Wang Z, Enver T. GATA-2 mediated regulation of normal hematopoietic stem/progenitor cell function, myelodysplasia and myeloid leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(3):457-460.
34. Tsai FY, Keller G, Kuo FC et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371(6494):221-226.
35. Nandakumar SK, Johnson K, Throm SL, Pestina TI, Neale G, Persons DA. Low-level GATA2 overexpression promotes myeloid progenitor self-renewal and blocks lymphoid differentiation in mice. *Exp Hematol* 2015;43(7):565-577.
36. Bodor C, Renneville A, Smith M et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica* 2012;97(6):890-894.
37. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica* 2014;99(2):276-281.
38. Wang X, Muramatsu H, Okuno Y et al. GATA2 and secondary mutations in familial myelodysplastic syndromes and pediatric myeloid malignancies. *Haematologica* 2015;100(10):e398-e401.

Figure 1

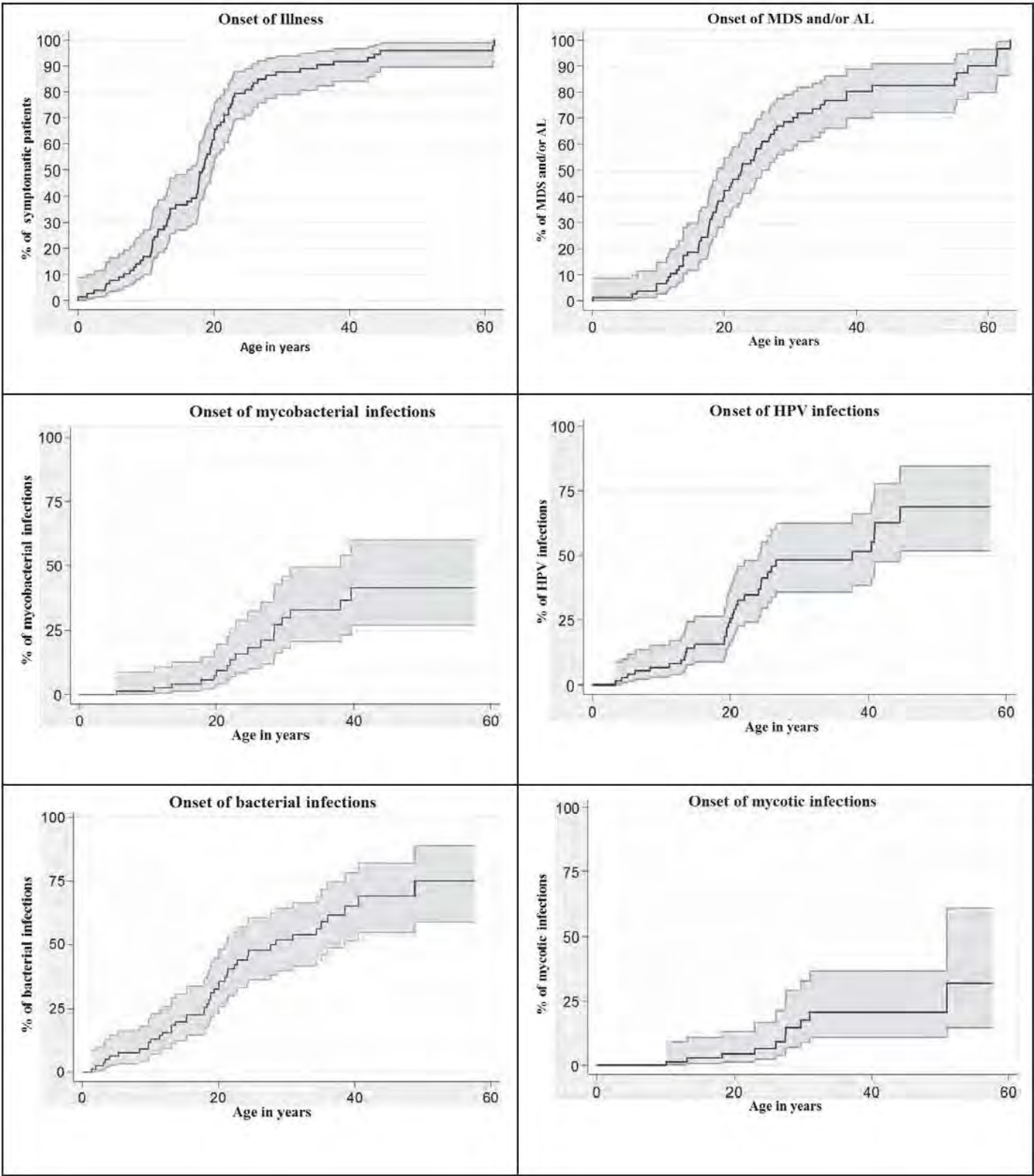


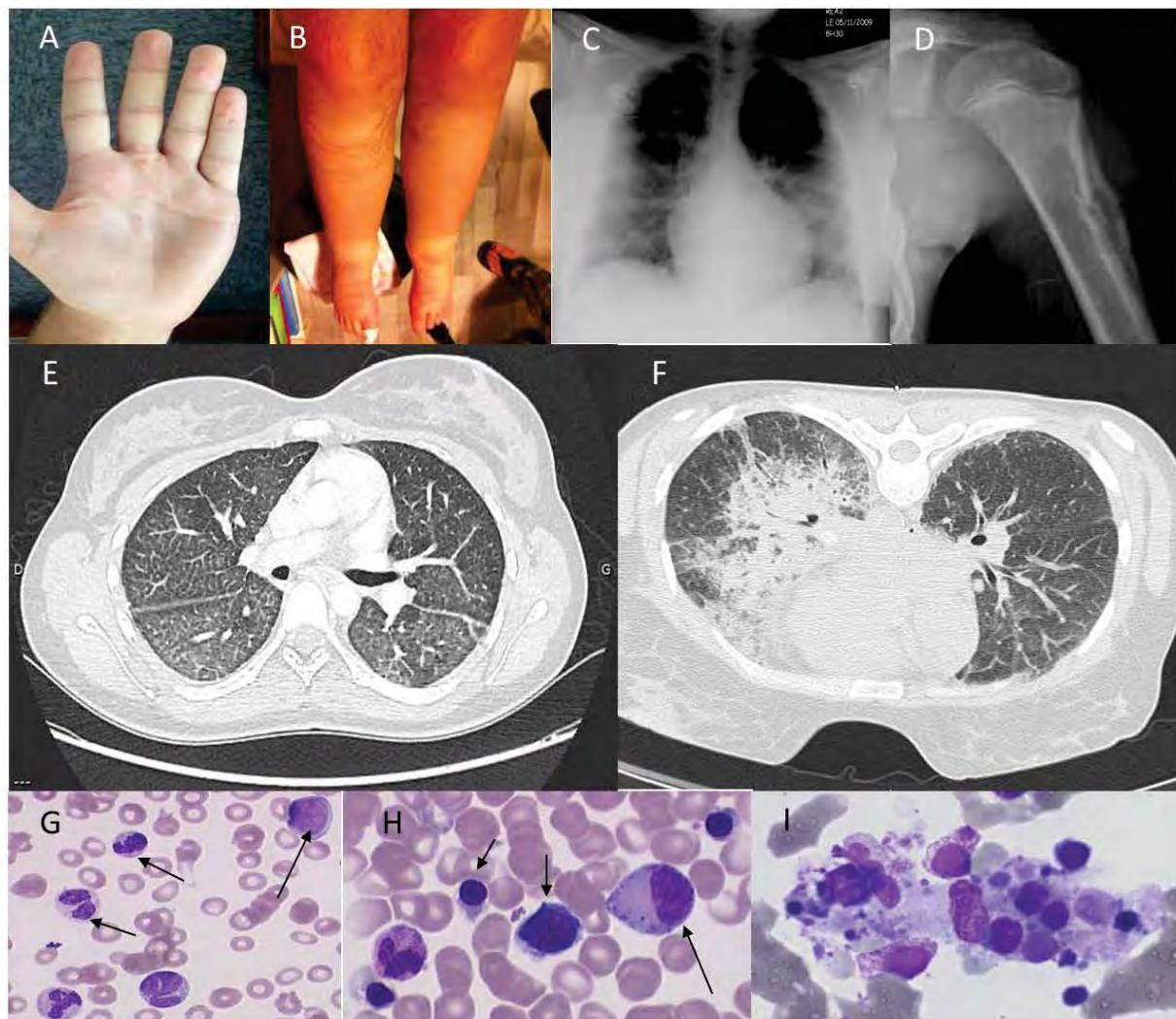
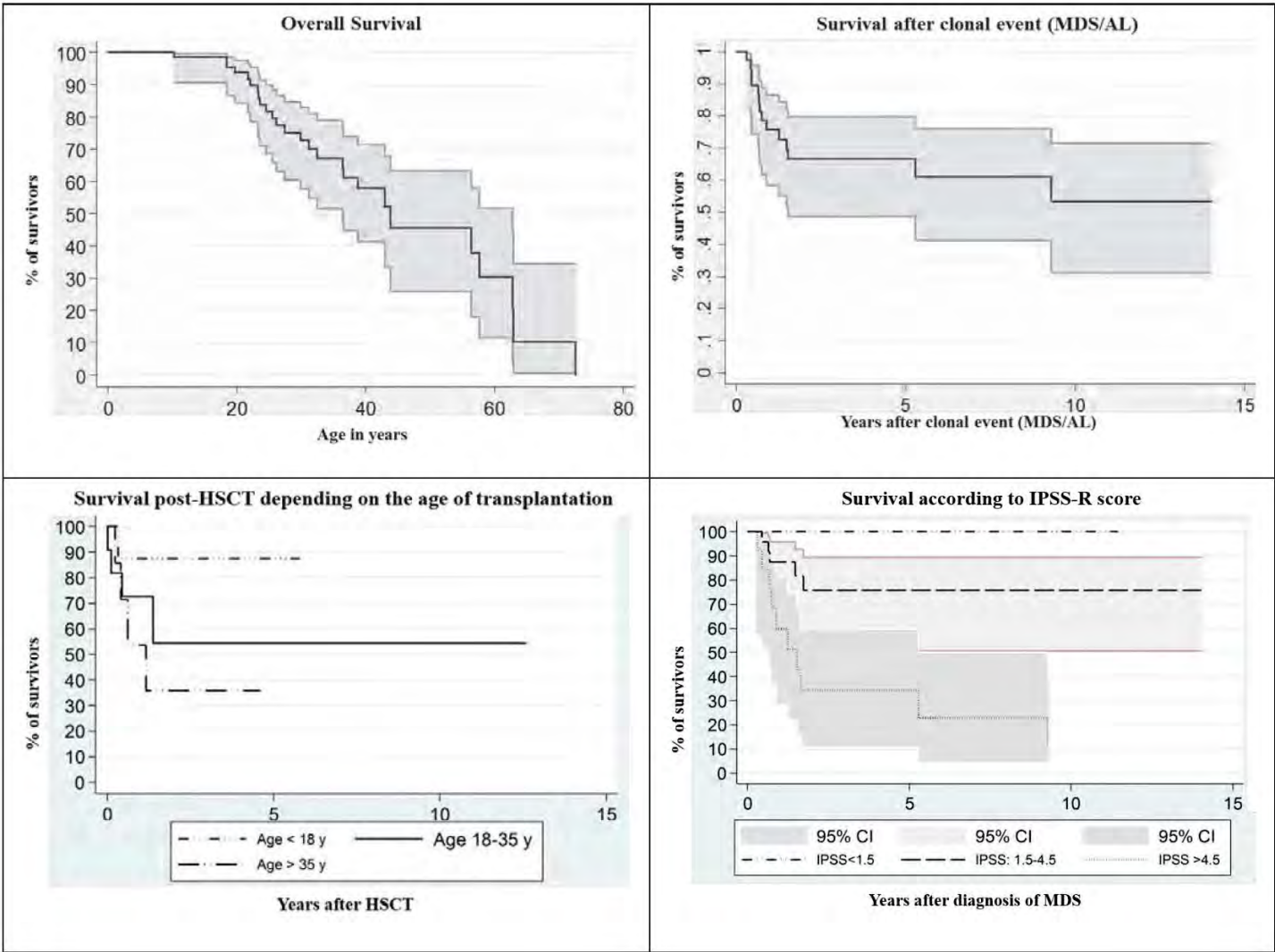
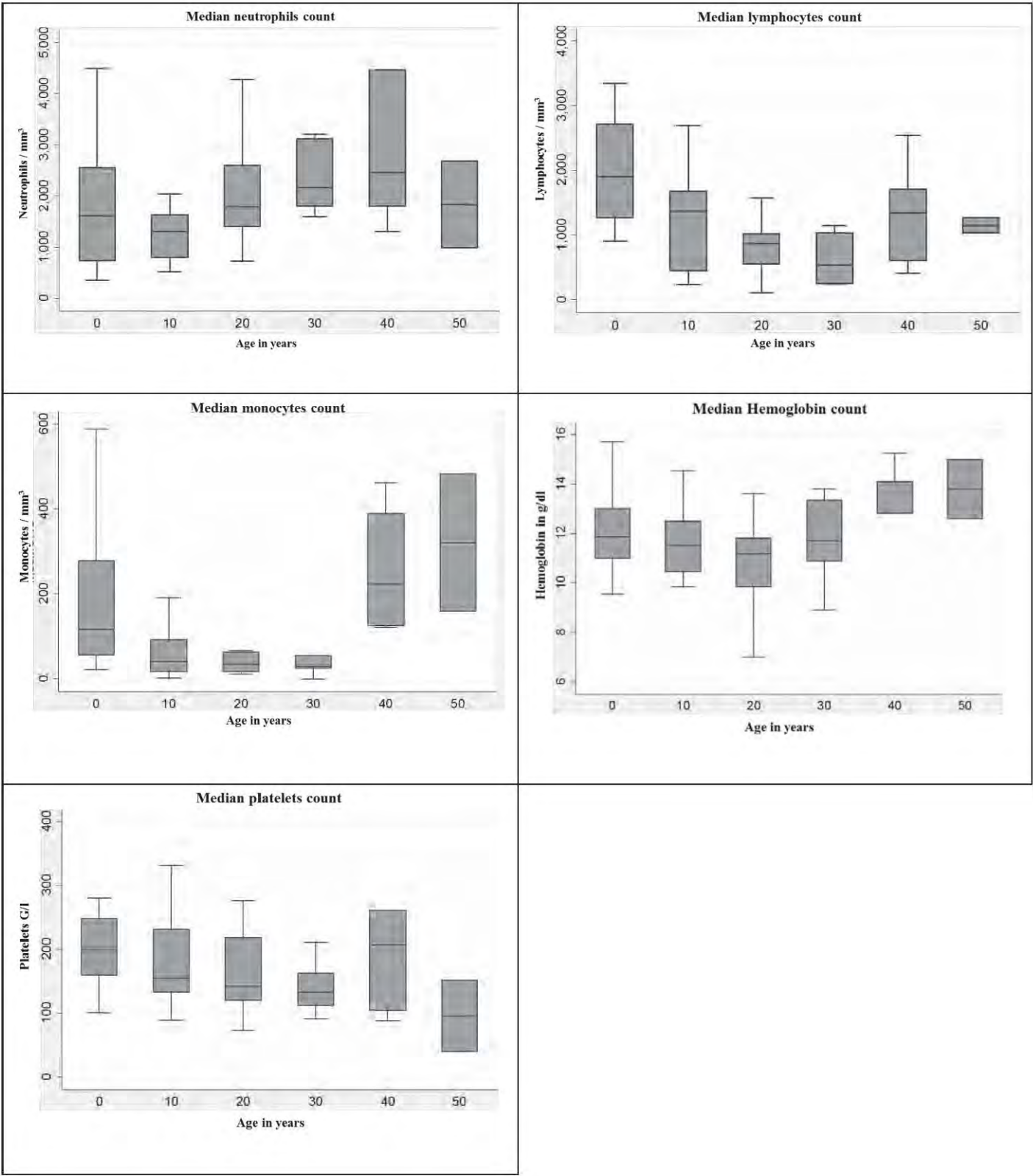
Figure 2

Figure 3



Supplemental Figure 1



Pedigree	Exon	Nucleotide change / protein effect	Affected domain	Mutation type	Age at first manifestations (years)	Hematology Immunology prior MDS/ AL	MDS/AL	Karyotype	Treatment	Infections	Other features	Vital status (Age)
P1*	2	c.[140T>G;142T>C;145T>C;177C>G] / p.[Val47_Phe49 delinsGLL;Y59*]		NS	22		MDS	Trisomy 8		Axillar abscess, Genital warts		A(24)
P2*	Int 2	c.229+13_229+14 insGCCins203_229+13; p.?		SD	19		MDS	Trisomie 8	HSCT	Cutaneous and genital warts (CIN III)		A(35)
P2 (brother)	Int 2	na		SD	21	Monocytopenia Neutropenia Lymphopenia Anemia Macrocytosis	MDS	Monosomy 7, Trisomy 1, 46XY, +1, der(1;7)(q10;p10), del(20)(q12)	HSCT	Pyocyanic infection Pulmonary and medullary tuberculosis, Pneumonia Genital / cutaneous warts, Labial HSV		D(25)
P2 (mother)	Int 2	c.229+13_229+14 insGCCins203_229+13; p.?		SD	44		MDS	NI		Pyelonephritis genital warts Dermohypodermitis Pneumonia	Rheumatisms, Miscarriage, Epidermoid carcinoma	A(56)
P2 (sister)	Int 2	na		SD	18	Macrocytosis	MDS	Monosomy 7 with complex chr 6 abnormality		CMV pneumonia E. Coli pneumonia, Pyoderma Grangrenosum septicemia		D(22)
P3*	3	c.317_318del / p.S106Cfs*78		FS	29	Monocytopenia	No	NI	EPO	Salpingitis, Disseminated Mycobacteriosis (M. Kansasi) leg amputation	Psoriatic arthritis Hypoparathyroidism, Interstitial lung disease (PAP), Hepatosiderosis	A(42)
P4*	3	c.353del / p.Val618fs		FS	11		MDS	Monosomy 7	HSCT	na		A(15)
P5*	3	c.423C>A / p.Y141*		NS	13		MDS	Monosomy 7	HSCT	Genital warts, Facial dermohypodermitis Zoster, sinusitis bronchitis post HSCT		A(44)
P6*	3	c.437del / p.G146fs		FS	17	Neutropenia Anemia	MDS	NI		Pneumonia, Colitis Salpingitis/ abscess and peritonitis EBV infection	Urinary system malformation (ureteral reflux)	A(18)
P6 (father)	3	na		FS	26	Lymphopenia Monocytopenia Neutropenia	MDS			Mycobacteriosis	Metastatic adenocarcinoma	D(32)

P7*	3	c.538G>T / p.E180*	NS	20	MDS	NI	Cutaneous warts	Urinary system malformation	A(22)
P8*	3	c.610C>T / p.R204*	NS	19	MDS, AML4	Trisomy 1q Der9 t(1;9)(q12;q1 2), r(9)(q12 ;q ?3 4), 11q23(2)	GCSF , Interferon , EPO, Chemotherapy	EBV infection, Cutaneous warts, Disseminated mycobacteriosis (M. Avium), Zoster, CMV (hemophagocytic syndrome)	D(26)
P9*	3	c.670G>T / p.E224*	NS	10	MDS	NI	GCSF	Cutaneous and genital warts	A(20)
P10*	4	c.890A>G / p.N297S	MS	22	MDS , AML0	Inv 3	Chemotherapy HSCT	Mucormycosis post HSCT	D(23)
P11*	4	c.915_916del / p.W306Afs*77	FS	4	MDS	Monosomy 7, 45, XY, - 7[7], 46, XY [18], +mar1, +mar2	HSCT	Pneumonia, Staphylococcus and mycobacterial osteomyelitis	A (15)
P12*	4	c.937C>T / p.H313Y	MS	21	MDS, Undifferentiated acute leukemia	Del5 Del7 T8 Add 10 Del12 Monosomy 18, Monosomy 21	HSCT	Viral meningitis skin HSV, hemophagocytic syndrome EBV-related	D(57)
P13*	4	c.941_951del /p.Y314Cfs*66	FS	18	MDS	Monosomy 7	HSCT	Flu infection	A(23)
P14*	4	c.944T>C / p.L315P	MS	1	No			Buttock abscess	A(8)
P15*	4	c.988C>T / p.R330*	NS	8	AML2	46XY, +1, der (1;7)(q10;p10),9qh+c[15] , 46,XY, 9qh+c[5] : trisomy 1q, monosomy 7q)	Chemotherapy	Cutaneous warts, Aspergillosis post- chemotherapy	D(18)
P15 (brother)	4	c.988C>T / p.R330*	NS	14	No			Meningococemia	A(23)
P15 (father)	4	c.988C>T / p.R330*	NS		No	9qh+			A(60)
P15 (brother)	4	c.988C>T / p.R330*	NS	17	MDS	46,XY,+1,der(1;7)(q10;p1 0) [2] / 45,XY,-21 [1] / 46,XY, [8]	HSCT	Recurrent otitis, Pneumonia, Cutaneous warts	A(25)
P15 (paternal uncle)	4	c.988C>T / p.R330*	NS	19	No			Cutaneous and Genital Warts	D(36)

P16*	Int 4	c.1017+572C>T	Regulatory	22	Monocytopenia lymphopenia	MDS	der(Y)t(Y;1)(q11.23;q21)	Pneumonia, Cutaneous warts	A(43)
P16 (brother)	Int 4	c.1017+572C>T	Regulatory	32		No		Migraine, Transient ischemic attack	A(39)
P17*	5	c.1018_1028del/ p.S340Kfs*40	ZF1 FS	10		MDS	NI	Mycobacteriosis (M. Genavense)	A(15)
P17 (daughter)	5	c.1018_1028del/ p.S340Kfs*40	ZF1 FS	9	Neutropenia Monocytopenia	No		Pneumonia	Premature A(41)
P18*	5	c.1020_1029dup/ p.R344Gfs*43	ZF1 FS	27		MDS	NI	EPO Pneumonia	Lymphedema PAP A(30)
P19*	5	c.1023del/ p.A342Pfs*45	ZF1 FS	11	Neutropenia Monocytopenia	No (but transient pancytopenia)	NI	GCSF Sinusitis, Legs folliculitis, Mycobacteriosis, Aspergillosis	D(27)
P19 (sister)	5	c.1023del/ p.A342Pfs*45	ZF1 FS	11	Monocytopenia	No	NI	Disseminated mycobacteriosis (M. Kansaii), Pyelonephritis	A(28)
P20*	5	c.1023dup/ p.A342Rfs*42	ZF1 FS	24		MDS	NI	Buttock abscess, recurrent Pneumonia, Subcutaneous abscess, Genital and cutaneous warts, septic shock	D(43)
P21*	5	c.1045T>C / p.C349R	ZF2 MS	20	Monocytopenia	MDS	46,XY,der(3)t dic(1;3)(p11; p25)	Cutaneous warts, Viral meningitis, Oral HSV, Mycobacterial pulmonary infection	Erythema nodosum A(20)
P22*	5	c.1060A>C / p.T354P	ZF2 MS	15	Neutropenia Monocytopenia	MDS	NI	Cutaneous warts Buccal HSV Recurrent sinusitis	Granulomatous dermatitis lupus-like A(19)
P23*	5	c.1061C>G / p.T354R	ZF2 MS	21	Neutropenia	MDS	46,XX [20] / 92,XXXX [2]	Genital warts, Pneumonia, Pulmonary Aspergillosis Mycobacteriosis (M. Avium), Mucormycosis	Sarcoidosis hemophagocytic syndrome D(24)
P24*	5	c.1070C>T / p.T357I	ZF2 MS	25	Neutropenia Monocytopenia	MDS	NI	ENT infections, Bronchitis, Genital warts	Takayasu's disease Cervical dysplasia A(33)

P25*	5	c.1076T>C / p.L359S	ZF2	MS	61	Neutropenia Monocytopenia	MDS	46,XX,del(5)(q2?3q3?3) [18] / 46,XX [2]	EPO Chemotherapy, HSCT	Bacterial septic shock, peritonitis post HSCT	Lymphedema Conn's syndrome hypothyroidism	D(63)
P25 (brother)	5	na	ZF2	MS	61	Neutropenia Anemia	MDS /AML2	NI	Chemotherapy , Vidaza, HSCT	Pneumonia, Septic shock, candida post HSCT		D(63)
P26*	5	c.1077_1082dup / p.Trp360_Arg361dup	ZF2	in-frame duplication			No					A(10)
P26 (mother)	5	na	ZF2	in-frame duplication	37	Lymphopenia Thrombocytopenia	MDS	47,XX,+8 [1] / 46,XX [24]		Cutaneous warts, Pneumonia, Meningitis		A (42)
P27*	5	c.1081C>G / p.R361Gly	ZF2	MS	23	G6PG deficiency Neutropenia Anemia lymphopenia	No			Flu infection	Lymphedema	D(29)
P28*	5	c.1082G>A / p.R361H	ZF2	MS	20	Neutropenia Monocytopenia Macrocytosis Anemia, ITP	MDS	NI		Cutaneous warts, Cystitis, Vulvar mycosis (candida)	Psoriasis, Interstitial lung disease (PAP), transient cerebral palsy	A(21)
P29*	5	c.1082G>A / p.R361H	ZF2	MS	25	Pancytopenia Macrocytosis	MDS, AML	45,XY,-7 [7] / 46,XY [24]	Chemotherapy	Cutaneous warts, Tuberculosis, Staphylococcus septicemia, aspergillosis post-chemotherapy		D(31)
P30*	5	c.1084C>T / p.R362*	ZF2	NS	8	Pancytopenia Macrocytosis	MDS	46,XX,del(20)(q11) [8] / 46,XX [12]	HSCT	Cutaneous warts, Oral HSV		A(30)
P31*	5	c.1084C>T / p.R362*	ZF2	NS	21		MDS	NI		Cutaneous warts , Inguinal folliculitis with recurrent scrotal abscess, Recurrent Perineal Abscess , Pneumonia	Polymalformative syndrome	A(25)
P32*	5	c.1084C>T / p.R362*	ZF2	NS	10	Monocytopenia Anemia	MDS	46,XY,+8 [14] / 46,XY [6]		Pulmonary tuberculosis, Dermohypodermatitis	Lymphedema, Psoriasis, Pulmonary Segmental edema, sarcoidosis like disease	A(34)
P33*	5	c.1084C>T / p.R362*	ZF2	NS	11	Neutropenia Lymphopenia Macrocytosis	MDS	NI		Dermohypodermitis	Lymphedema, Apthous stomatitis	A(12)
P34*	5	c.1085G>C / p.R362P	ZF2	MS	17	Neutropenia Monocytopenia Macrocytosis	MDS , AML	48 XY, +8, +8 [17]; 46 XY [1]	Chemotherapy	Cutaneous and genital warts, Tight boil, Chronic hepatitis B , Arm abscess		D(38)

P34 (brother)	5	c.1085G>C / p.R362P	ZF2	MS	17		MDS, AML	Monosomy 7	Chemotherapy	Dermohypodermatitis	Lymphedema	D(23)
P35*	5	c.1103_1104del / p.P368Rfs*15	ZF2	FS	43	Megakaryocytic dys trophy	No			Progressive multifocal leuco-encephalopathy		D(43)
P36*	5	c.1114G>A / p.A372T	ZF2	MS	13		AML5	Monosomy 7 , trisomy 15, Trisomy 20 t(11;19)	Chemotherapy	Pneumonia, Labial HSV, H1N1 Influenza, Aspergillosis post chemotherapy	Vesicular lithiasis	D(18)
P37*	5	c.1114G>A / p.A372T	ZF2	MS	42		MDS	trisomy 8	EPO	Dermohypodermatitis, Oesophageal candidiasis, Arthritis, Pneumonia	Lymphedema Breast cancer Deep vein thrombosis sweet syndrome	D(72)
P37 (son)	5	na	ZF2	MS	18		CMMML	Monosomy 7	Chemotherapy HSCT	Pneumonia		D(19)
P38*	5	c.1114G>A / p.A372T (c.1367dup / p.T457Dfs*79 (ex6) considérée comme somatique)	ZF2	MS	20	Neutropenia Monocytopenia Thrombocytopenia	AML 2	?der(7)?r(7)(?p ?q) [22] del7 q in Fish	HSCT	Pneumonia EBV-related		D(21)
P39*	5	c.1118G>A / p.C373Y	ZF2	MS	17		MDS	Tri1 Monosomy 15		Recurrent otitis Pneumonia Cutaneous warts	Interstitial lung disease Lymphedema Erythema nodosum Panniculitis	A(20)
P40*	5	c.1142del / p.Asn381Metfs*6	ZF2	FS	14	Lymphopenia Monocytopenia Neutropenia Macrocytosis	MDS	N		Cutaneous warts, pneumonia, Influenza A (hemophagocytic syndrome), pyocyanic infection, aspergillosis, candidiasis, streptococcus sepsis		A(28)
P41*	Int 5	c.1143+5G>C / p.?	ZF2	SD	11	Monocytopenia Macrocytosis	MDS	Trisomy 8	HSCT	Recurrent Pneumonia Genital warts		A(18)

P42*	6	c.1154C>A / p.P385Q	ZF2	MS	18	Monocytopenia	MDS	NI	Disseminated Mycobacteriosis (M.Avium), Pneumonia, Genital warts	Lymphedema, Poncet's disease Rosacea	A(43)	
P42 (sister)	6	c.1154C>A / p.P385Q	ZF2	MS	17	Neutropenia Monocytopenia	MDS	NI	Vulvar abscess, Genital and cutaneous warts, Sinusitis, Pelvic cellulitis, Aspergillosis	CIN2 Lymphedema	A(39)	
P42 (son)	6	c.1154C>A / p.P385Q	ZF2	MS			No				A(15)	
P42 (sister)	6	c.1154C>A / p.P385Q	ZF2	MS	24	Monocytopenia	ALL T	Monosomy 7	Vulvar cellulitis Septic shock, candida post chemotherapy	Rheumatoid purpura Deep vein thrombosis	D(24)	
P43*	6	c.1162A>G / p.M388V	ZF2	MS	12	Neutropenia Monocytopenia Thrombocytopenia Macrocytosis	MDS	Monosomy 7q Trisomy 8			A(20)	
P43 (mother)	6	c.1162A>G / p.M388V	ZF2	MS	44	Monocytopenia	MDS	Trisomy 8	Genital warts (large surgery) Cutaneous HSV, Pneumonia, Aspergillosis	Rosacea, Genital carcinoma, Myocardial infarction	D(56)	
P44*	6	c.1186C>T / p.R396W	ZF2	MS	9		MDS	Monosomy 7	Bronchitis Aspergillosis post-HSCT	Atypical Kawasaki syndrome with arthritis hemophagocytic syndrome	D(10)	
P45*	6	c.1186C>T / p.R396W	ZF2	MS	9	Neutropenia Monocytopenia	MDS, AML 4	Monosomy 7, Monosomy 21	Chemotherapy HSCT	asthenia	A (10)	
P45 (brother)	6	c.1186C>T / p.R396W	ZF2	MS	7		MDS	NI	Chemotherapy	premature	A (7)	
P45 (mother)	6	na	ZF2	MS	25		MDS		na	na	A (39)	
P46*	6	c.1187G>A / p.R396Q	ZF2	MS	16	Monocytopenia	MDS	Trisomy 8	Chronic EBV replication	Pulmonary embolism Factor V Leiden mutation	A(21)	
P46 (mother)	6	c.1187G>A / p.R396Q	ZF2	MS	23	Neutropenia Monocytopenia	AML M2	NI	Chemotherapy	Recurrent gingivitis, Aspergillosis post-chemotherapy	Rosacea Miscarriage	D(37)
P46 (brother)	6	c.1187G>A / p.R396Q	ZF2	MS	6		MDS	Monosomy 7	Chronic EBV replication Pneumonia	premature	A(11)	

P46 (brother)	6	c.1187G>A / p.R396Q	ZF2	MS	13	Monocytopenia	AML M2	Trisomy 11 Monosomy 7	Chemotherapy HSCT	ENT infections Recurrent Pneumonia	Tight fibroma Factor V Leiden mutation	A(19)
P47*	6	c.1192C>T / p.R398W	ZF2	MS	0		JMML	NI		Bronchiolitis		A(4)
P48*	6	c.1193G>A / p.R398Q	ZF2	MS	19	Neutropenia Thrombocytopenia	MDS	NI	HSCT	Pneumonia, Cellulitis, Disseminated mycobacteriosis, Hemophagocytic syndrome	Splenic vein thrombosis, Rectal adenoma (low grade dysplasia)	A(40)
P48 (son)	6	c.1193G>A / p.R398Q	ZF2	MS			No					A(13)
P48 (daughter)	6	c.1193G>A / p.R398Q	ZF2	MS			No					A(8)
P49*	6	c.1193G>A / p.R398Q	ZF2	MS	25		MDS	Trisomy 8	GSCF	Mycobacteriosis (M. Chelonae, M. Avium)		A(31)
P50*	2-6	c.1-?_1443+?del / p.0?	ZF1- ZF2	Whole gene deletion	18	Monocytopenia Neutropenia	MDS	NI		Pilonidal cyst abscess, Amygdala phlegmon, Toxoplasmosis, Orchi-epididymitis, Hepatitis A		A(25)
P51*	2-6	c.1-?_1443+?del / p.0?	ZF1- ZF2	Whole gene deletion	13	Neutropenia Monocytopenia Macrocytosis	MDS	Monosomy 7 Trisomy 8	Vidaza HSCT	Pyelonephritis, Pneumonia, Oral and genital HSV post HSCT	Urinary system malformation, lymphedema	A(18)
P52*	2-6	del3q21	ZF1- ZF2	Whole gene deletion	2	Neutropenia Monocytopenia	MDS AML	Monosomy 7	Vidaza	Oral HSV, Cutaneous warts, Staphylococcal Folliculitis, Pneumonia	Polymalformation Behavioral disorder	A(21)

Table 1. Clinical and biological presentation of 78 patients with GATA2 mutations

- P= Pedigree, * =proband
- mutation type : FS = Frameshift, MS =Missense, NS = Non-sens, SD = Splice Defect ; caryotype: NI = Normal
- Vital status : A = Alive, D = Dead
- AL= Acute leukemia, ALL = Acute lymphocytic leukemia, AML = Acute myeloid leukemia, CIN = Cervical Intraepithelial Neoplasia, CMMML= chronic myelomonocytic leukemia, CMV = Cytomegalovirus, EBV = Epstein Barr Virus, EPO = Erythropoietin, GCSF = Granulocyte-colony stimulating factor, HSCT = Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSV = Herpes Simplex Virus, Int = Intron, ITP = Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, MDS = Myelodysplasia, na = not analyzed, PAP= pulmonary alveolar proteinosis, ZF1 = first zinc finger, ZF2= second zinc finger

Diagnostic features	Clinical and biological aspects	Incidence in French National Registry of chronic Neutropenia	Incidence in published cohort (Collin, Spinner)
Hematological features	Thrombopenia Anemia Macrocytosis Mild chronic Neutropenia MDS AML ALL Aplastic anemia Juvenile myelomonocytic leukemia	18% 10.2% 14% 39% 70.5% 19.2% 1.2% 2.6% 1,2%	 47% 84% 14% 0% 0%
Recurrent infections - viral (HPV, HSV, flu, EBV, CMV, chicken pox) - mycobacterial - fungal (aspergillosis, candidiasis)	MonoMac Syndrome - Monocytopenia - B Lymphopenia - NK Lymphopenia	49% 100% 7.8%	78% 86% 82%
Recurrent upper respiratory tract bacterial infections	Otitis, sinusitis	6%	10-20%
Warts	HPV related (genital and cutaneous) Oncogenesis	38% 3.8%	60-70%
Lymphoedema		14.1%	11-20%
Pulmonary feature	Pulmonary Alveolar proteinosis Abnormal pulmonary function tests Pulmonary arterial hypertension Recurrent bacterial infections	3.8% 65%	18% 50% 10% 14%
Oncogenesis	HPV or EBV related Skin cancer > 35 years Breast cancer Adenocarcinoma Conn adenoma	3.8% 1.2% 1.2% 1.2% 1.2%	20-35% 11% 22%
Vascular features	Aortic dissection Thrombosis, myocardial infarction	1.2% 9%	25%
Deafness		1,2%	20%
Cutaneous features	Panniculitis, erythema nodosum, vascularitis, lupus-like and sarcoidose-like syndrome, sweet syndrome	10.3%	30%
Other features	Progressive multifocal leukoencephalopathy (JCV) Urinary system malformation Premature labour, miscarriage Hypothyroidism	1,2% 3.8% 6.4% 1.2%	33% 14%

Table 2. Clinical and biological features of GATA2 mutated patients

CMV= Cytomegalovirus, EBV: Epstein Barr virus, HPV : Human papillomavirus, JCV=JC virus, LAL Acute lymphocytic leukemia, AML = Acute myeloid leukemia, MDS=Myelodysplasia, NK= Natural Killer.

Manifestations cliniques associées aux mutations germinales de GATA2

Mutations germinales de GATA2 : corrélations génotype-phénotype

Actuellement, quatre cohortes regroupant des patients pédiatriques et adultes ont été publiées dans la littérature : France 14 patients ⁴, Etats Unis 57 patients ³, Royaume Uni 30 patients ³⁰¹, et enfin une cohorte Allemande de 57 patients MDS pédiatriques ³⁰².

Malgré le nombre croissant de mutations décrites, il semble qu'aucune corrélation patente génotype/phénotype n'ai pu émerger à l'heure actuelle, mise à part l'association entre lymphœdème et mutations des zones régulatrices ou décalant le cadre de lecture (mutation nulle) ³. Les formes familiales de LAM/MDS semblent s'associer plus facilement avec des substitutions situées sur le second doigt de Zn même si les faibles effectifs de chaque cohorte publiée ne permet pas de dégager de significativité ^{2-4,288,301}. Les patients avec de larges délétions du gène présentent des manifestations malformatives associées, pouvant s'expliquer par la délétion large de gènes contigus ³⁰³. Notre cohorte nationale de 81 patients retrouve les mêmes constatations mais ne permet pas à ce jour de dégager de corrélation statistiquement significative.

Evolutivité temporelle, pénétrance, expressivité

Cette pathologie semble le plus souvent relativement indolente dans les premières années de la vie, pouvant essentiellement se manifester par des épisodes infectieux récurrents des voies aériennes, alors qu'à l'âge adulte, les manifestations cliniques hématologiques et infectieuses sont potentiellement rapidement létales. Les manifestations cliniques peuvent être présentes chez un même malade successivement et touchent les patients à tout âge, avec une transmission autosomique dominante et une pénétrance forte au sein des familles ^{3,4,301,304}. La médiane d'âge des premiers symptômes est de 17.8 ans (de 0 à 61 ans) dans notre cohorte, 62% et 88% des patients étant symptomatiques respectivement à 20 ans et à 40 ans, traduisant une forte pénétrance. Seuls 5 patients sur 78 restent a- ou paucisymptomatiques (si l'on considère les infections répétées de la petite enfance) aux dernières nouvelles, deux d'entre eux étant âgés respectivement de 42 et 60 ans. Le tableau 2 de l'article 2 résume les différents éléments clinico-biologiques évocateurs de mutation de GATA2 chez un même malade ou une famille.

Manifestations cliniques

Manifestations hématologiques

Les hémogrammes des patients sont évocateurs de mutation *GATA2* quand ils associent une monocytopenie souvent profonde, une neutropénie modérée associée ou non à d'autres cytopénies, une macrocytose et des anomalies immunologiques (lymphopénie NK et B). L'hémogramme évolue avec l'âge et les cytopénies peuvent apparaître tardivement, la macrocytose témoignant d'une dysfonction médullaire débutante. L'évolution clinique est marquée par un risque majeur de transformation clonale myéloïde sous forme de MDS ou de LAM^{1-4,302,305}. Un quart des patients de notre cohorte est diagnostiqué au stade d'hémopathie maligne. Le risque cumulé de transformation maligne est parmi les plus élevés dans les syndromes de susceptibilité génétique aux leucémies atteignant 90% à l'âge de 60 ans dans la cohorte anglaise¹, 84% et 14% des patients du NIH développent respectivement une MDS ou LAM³. Dans notre série initiale de 14 patients, l'incidence cumulative d'hémopathies myéloïdes était de 54% à 20 ans et 73% à 30 ans⁴, avec un possible biais lié au recrutement et au faible effectif. La cohorte actuelle de 78 patients a permis de confirmer ce risque élevé de 40% (95% CI: 28%- 42.9%) à 20 ans, et 79% (95% CI: 62.8%-85%) à 40 ans. Le calcul de ce risque de MDS ou de LAM pose des questions de méthodes. En effet, à peine 5 ans après la description de cette pathologie, les effectifs des 4 cohortes disponibles ne dépassent pas au total 200 patients au monde et on peut craindre des biais de recrutement, *GATA2* ayant été étudié spécifiquement selon les conditions de recrutement en contexte hématologique ou immunologique. Mais la concordance des résultats des 4 cohortes plaide pour considérer que ce risque est avéré. La dernière cohorte de MDS pédiatriques publiée par l'EWOG retrouve une mutation *GATA2* germinale chez 7% des enfants avec MDS primaire et 15% pour des maladies avancées³⁰².

L'examen du frottis de moelle au cours du suivi de ces patients retrouve des signes de dysplasie dans plus de 80% des cas et l'hypocellularité est pratiquement constante. Les mégacaryocytes sont souvent nombreux mais atypiques quel que soit le statut hématologique. La biopsie ostéo-médullaire montre souvent une augmentation de la trame réticulinique. Un excès de LGL a été observé dans un certain nombre de cas³⁰⁶. On doit souligner que l'aspect médullaire observé, même sans anomalie cytogénétique identifiée, ni anomalie hématologique majeure (« état stable »), est profondément anormal,

pratiquement toujours considéré comme dysplasique ce qui rend difficile la distinction entre phase stable de la maladie et transformation clonale. Il reste actuellement compliqué de réaliser un score pronostic associé à une sanction thérapeutique lourde comme la greffe de moelle. Le score IPSS (International Prognosis Scoring System) communément utilisé en pédiatrie et chez les adultes permet néanmoins d'appréhender au mieux les corrélations clinico-biologiques et de proposer un rationnel pour le traitement. Dans notre cohorte, les patients ayant un IPSS élevé présentent souvent une chimiorésistance et une évolution défavorable alors que les patients présentant un IPSS bas (score=1) peuvent rester stables pendant plusieurs années sans événement clonal. La survie à 5 ans des patients ayant un IPSS > 4,5 est de 30%, 80% dans le groupe médian (IPSS entre 1,5 à 4,5) et 100% dans le groupe bas risqué (IPSS=1)($p<0,001$) (Pasquet et al, manuscrit en préparation, article 2).

L'évolution vers une hémopathie maligne est fréquemment associée à la survenue d'anomalies clonales (jusqu'à 85% des cohortes) ³⁰². Les anomalies cytogénétiques les plus fréquemment observées sont une monosomie 7 et/ou une trisomie 8 acquises dans 7 à 25% des cas. L'acquisition d'anomalies génétiques moléculaires somatiques additionnelles reste une voie d'étude indispensable à la compréhension des mécanismes de leucémogénèse. Des mutations d'*ASXL1* ont été initialement décrites associées à une monosomie 7 chez ces patients ^{305,307-309}. D'autres mutations somatiques ont été rapportées chez des patients ayant des mutations hétérozygotes de *GATA2* et présentant des LAM et/ou MDS familiales parmi lesquelles *NRAS*, *RUNX1*, *STAG2*, *IDH2*, *TP53* et *SETBP1* ^{309,310}. L'analyse par séquençage d'exome chez ces patients permettra probablement de mieux comprendre les bases moléculaires du développement d'hémopathies malignes et reste un axe de recherche du laboratoire.

Dans le registre des neutropénies, un cas de leucémie aigüe lymphoblastique T a été rapportés chez un patient présentant une mutation *GATA2* et un cas de leucémie myélomonocytaire juvénile chronique (JMML) a été observé chez un nourrisson avec une résolution spontanée dans la petite enfance. Dans la littérature un cas de LAL B avec monosomie 7 vient d'être rapporté ³¹¹, ainsi qu'un cas de JMML atypique avec monosomie 7 chez un patient présentant une double hétérozygotie *GATA2* avec mutation somatique *KRAS* ³¹². Cela incite à reconsidérer le rôle potentiel des mutations de *GATA2* dans le développement d'hémopathie lymphoïde et le rôle de ce facteur de transcription à un stade très précoce de l'hématopoïèse (progéniteurs lymphoïde commun).

Des cas d'aplasies médullaires atypiques ont aussi été rapportés. Celles-ci sont associées à un cortège immuno-hématologique rendant caduque le diagnostic d'aplasie médullaire idiopathique, à savoir monocytopenie, lymphopénie B et NK, ratio CD4/CD8 des lymphocytes T inversé, dysplasie mégacaryocytaire et fréquences des anomalies cytogénétiques³¹³.

Déficit immunitaire : syndrome DLMC ou MonoMAC

Le déficit immunitaire associé aux mutations de *GATA2* est complexe, affectant à la fois l'immunité innée et adaptative, de manière variable selon les individus. Ce déficit a été décrit sous le terme MonoMAC ou DMLC pour déficit en cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B et Natural Killer (NK)^{286,298,301,304,314-316}. Sur le plan clinique, les patients présentent une susceptibilité particulière aux infections virales à papillomavirus cutanées ou génitales (entre 40 et 70% des patients selon les séries), souvent associées à des verrues profuses et à une oncogenèse génitale. Les infections à virus du groupe herpès dont EBV, CMV, HSV (10 à 35%), et d'autres infections virales sévères comme la grippe sont très souvent notées³¹⁷. Un cas de leucoencéphalite multifocale progressive (LEMP) a été observé chez un patient adulte de la cohorte française, avec la mise en évidence du virus JC dans les prélèvements biopsiques *post-mortem* (Article 2). Ce déficit immunitaire est aussi caractérisé par une susceptibilité aux infections à mycobactéries environnementales (*Mycobacterium avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. genavensae*), avec une fréquence variable selon le recrutement institutionnel (jusqu'à 50% dans la cohorte américaine et 25% dans la cohorte française) responsables d'une morbi-mortalité importante. On retrouve chez ces patients un sur-risque d'infections fongiques, notamment aspergillose invasive, histoplasmoses, candidose systémique, blastomycose et mucormycose, observées le plus souvent au décours des chimiothérapies dans le traitement des hémopathies^{301,316,318,319}. Ces dernières sont responsables d'une morbi-mortalité importante. Des infections bactériennes sont aussi rapportées chez environ 50% des patients: bactériémie, infections cutanées, pneumopathies et infections digestives plus rarement, certaines graves à *Clostridium difficile*. Six patients ont présenté un syndrome d'activation macrophagique au décours des épisodes infectieux, élément partagé dans la littérature^{319,320}. Sur le plan biologique, la mise en évidence de ce déficit immunitaire demeure délicate, car le phénotypage lymphocytaire basal, les tests fonctionnels lymphocytaires et le dosage pondéral des immunoglobulines sont généralement normaux ou montrent une discrète

hypogammaglobulinémie (portant sur les sous classes IgG2 et IgG4) voire une hypergammaglobulinémie. La lymphopénie B affecte les précurseurs médullaires et les cellules naïves, mais peu ou pas les cellules B mémoires et plasmocytaires, permettant le maintien d'une réponse humorale^{298,315,321,322}. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes sont réduites dans le sang circulant³²³. La lymphopénie NK est fréquente et profonde, avec un déficit électif de la population CD56^{bright}, cellules NK immatures³²⁴. Le taux de lymphocytes T est relativement préservé, avec une inversion fréquente du rapport CD4/CD8. La monocytopénie est fréquente, souvent profonde mais non constante, notamment chez les patients avec MDS³⁰², la neutropénie est variable (profonde, modérée ou absente), avec une grande variabilité intrafamiliale. Du fait de leur facilité à être détectées sur un simple hémogramme et avant tout autre complication, l'anémie, la neutropénie chronique et la monocytopénie peuvent conduire à un diagnostic précoce, avant l'apparition de manifestations infectieuses ou d'une hémopathie maligne.

Atteintes lymphatiques et cardio-vasculaires

La publication initiale d'Emberger *et al.* rapportait dans une famille de la région de Montpellier l'association lymphœdème primitif, surdité de perception et prédisposition au développement de LAM^{241,287,300,303}. Le lymphœdème peut être uni- ou bilatéral et survenir à tout âge, avant ou après l'apparition d'une hémopathie, voire après transplantation médullaire⁴. Il se distingue du lymphœdème congénital qui est bilatéral et survient lorsque l'enfant commence à marcher. Parmi les patients porteurs de mutations de *GATA2*, environ 10% à 20% ont cette présentation dans l'ensemble des cohortes publiées^{3,4,301}.

Des cas de thromboses sont aussi rapportés jusqu'à 25% dans la cohorte américaine, avec cependant de nombreux co-facteurs associés (prédispositions génétiques, contexte d'hémopathie, d'allogreffe, lymphœdème des membres inférieurs), rendant difficile l'imputabilité unique des mutations de *GATA2* chez ces patients. Dans la cohorte française 7 patients ont présenté des complications thrombotiques, 4/7 présentaient des co-facteurs favorisant (post splénectomie, LAL, cancer du sein, Factor V Leiden). L'observation de cas isolés de dissections aortiques, d'infarctus précoces chez ces patients et d'une incidence anormalement élevée de mort subite chez les apparentés, suggèrent une atteinte de l'endothélium vasculaire plus large, notamment de l'endothélium artériel²⁴¹.

Atteintes pulmonaires

A côté des maladies infectieuses déjà évoquées (infections à mycobactérie environnementale, infections fongiques), une protéinose alvéolaire, probable conséquence d'un défaut de phagocytose des macrophages, peut être associée aux mutations de *GATA2*. Celle-ci peut être la porte d'entrée dans la maladie, avec comme caractéristique de s'accompagner de l'absence d'anticorps anti GM-CSF et de ne pas répondre à l'administration sous cutanée ou inhalée de GM-CSF ³²⁵. Les lavages pulmonaires peuvent être partiellement efficaces. Une hypertension artérielle pulmonaire est parfois associée. La physiopathologie reste mal comprise, notamment la présence de macrophages alvéolaires dans le liquide de lavage alvéolaire et dans les biopsies pulmonaires, en l'absence de monocytes circulants, souligne une probable conséquence fonctionnelle liée aux mutations de *GATA2* sur l'homéostasie macrophagique pulmonaire ³²³. Dans notre cohorte, seuls 3 patients présentent ce type de complication.

Des anomalies de diffusion et de ventilation (syndrome restrictif, obstructif ou mixte) sont souvent présentes chez les patients porteurs d'une mutation de *GATA2* (jusqu'à 50% des cas décrits), bien qu'inconstamment testée ³²⁶. Le traitement par allogreffe de moelle osseuse, quand il est réalisé avant la survenue de complications menaçant le pronostic vital, permet une amélioration de la fonction pulmonaire et parfois une régression de la protéinose alvéolaire ^{3,327}.

Tumeurs solides

En plus des hémopathies malignes, des tumeurs solides sont observées, souvent conséquences des infections à papillomavirus (dysplasies intra-épithéliales, carcinomes vulvaires, cancer de l'oropharynx), à virus d'Epstein-Barr (lymphome non Hodgkinien, léiomyosarcome, cancer du foie) ^{316,317}, ou récemment à poliomavirus (Merckel cell carcinoma) ³²⁸. Des cas de tumeur desmoïde, adénocarcinome du pancréas et du rein et adénome de Conn ont été rapportés. 22% des femmes de plus de 35 ans ont développé un cancer du sein (dont une avait une mutation *BRCA2* associée) dans la cohorte du NIH, fréquence que nous ne retrouvons pas dans la cohorte française ou seulement un cas est décrit parmi nos 78 patients. Des cas de cancers cutanés (spino, baso-cellulaire, mélanome) ont aussi été décrits chez environ 10% des patients ^{1,3}.

Atteintes dermatologiques et auto-immunes

Les atteintes dermatologiques peuvent être très variées, soulignant la nécessaire sensibilisation des dermatologues à la reconnaissance de ce syndrome clinico-biologique. Elles relèvent souvent d'une étiologie infectieuse, et c'est le cas des verrues récurrentes génitales et/ou des membres liées à l'HPV, présentes fréquemment au début de l'histoire clinique. Les dysplasies liées à HPV et carcinomes vulvaires sont une évolution fréquente de ces verrues ^{3,316}. Ont aussi été décrits des cas d'infections cutanées à HSV ³²⁹. Les autres lésions retrouvées peuvent être un érythème noueux, une panniculite et sont elles aussi souvent associées à une infection chronique à mycobactérie, fongique et/ou à un lymphœdème persistant ^{318,330}.

Des cas de sarcoïdoses ou sarcoidose-like, ainsi que d'autres manifestations auto-immunes ont aussi été décrits chez 9 patients dans notre cohorte, et des marqueurs auto-immuns peuvent être associés, même s'ils sont inconstamment recherchés. Un cas d'hépatite auto-immune a été décrit récemment ³³¹.

Autres atteintes

Surdité

Des cas de surdité ont été rapportés liées aux mutations de *GATA2*, soulignant le rôle clef de ce gène au niveau des canaux semi-circulaires. La prévalence est variable selon les cohortes, jusqu'à 20%, et plus faible dans la cohorte française où un seul patient est rapporté ^{1,3,4}. Il est à noter que la non-réalisation systématique d'audiogramme sous-estime très probablement ce chiffre.

Fausses couches

De nombreuses femmes ont présenté des fausses couches, précoces ou tardives, comme cela a été le cas à 3 reprises chez notre famille index ⁴ et il est difficile d'avoir une idée plus précise sur la fréquence de ces complications obstétricales, car ces informations ne figurent pas toujours dans l'anamnèse clinique. Le NIH rapporte un chiffre de 33% ³. L'expression de *GATA2* dans le trophoblaste et l'implication de *GATA2* au niveau de l'utérus de souris gestantes pourrait expliquer l'importance de ce gène chez les mammifères, dont l'homme, lors de la gestation par la médiation de la signalisation hormonale ^{247,332,333}.

Atteintes endocriniennes

Une hypothyroïdie peut être observée mais sa prévalence est proche de celle de la population générale, rendant moins certain le lien avec la mutation de *GATA2*. Les mutations *GATA2* sont aussi parfois associées à des malformations de l'appareil uro-génital et à un retard intellectuel dans les délétions larges du gène, emportant probablement d'autres gènes contigus. Enfin, Wlodarski *et al.* rapportent l'existence de troubles neurologiques à type de retard de développement³⁰².

Diagnostic différentiel des mutations *GATA2*

Le tableau 2 résume les principaux diagnostics différentiels à évoquer devant une mutation *GATA2*.

Familial MDS/AML [67]	Warts/HPV infections [51]	Mycobacterial infections [68–70]	Congenital lymphedema [71–73, 75, 76]	Pulmonary alveolar proteinosis [77]
<i>TERT/TERC</i> <i>CEBPA</i> <i>RUNX1</i>	<i>DOCK 8</i> <i>CXCR4</i> <i>HIV/CD4↓</i> <i>TMC6/8</i> <i>SPINK5/LEKT1</i> <i>STK4/MST1</i>	<i>IFNGR1</i> <i>IFNGR2</i> <i>IL12RB1</i> <i>STAT1</i> (loss of function; AR and AD) <i>IRF8</i> <i>CYBB</i> (macrophage-specific mutation) <i>TYK2</i> <i>ISG15</i> <i>IKKG</i> (NEMO)	<i>FLT4</i> <i>GJC2</i> <i>FOXC2</i> <i>SOX18</i> <i>CCBE1</i> <i>PTPN14</i>	Anti-GM-CSF Ab <i>CSF2RB</i>

MDS, myelodysplastic syndrome; AML, acute myeloid leukemia; HPV, human papillomavirus.

Tableau 2. Principaux diagnostics différentiels des mutations *GATA2*³³⁴.

Survie globale et évolution

La survie globale des patients ayant des mutations hétérozygotes de *GATA2* est liée à la survenue d'événements oncogéniques, et notamment d'hémopathies malignes, ainsi qu'aux complications du déficit immunitaire : elle atteint 77% et 45% aux âges respectifs de 40 et 60 ans dans la cohorte du NIH, chiffres similaires à ceux retrouvés dans la cohorte française, néanmoins un peu plus péjoratifs, à savoir 58% à 40 ans et 30% à 60 ans (Pasquet *et al.*, en préparation, article 2).

Prise en charge thérapeutique des patients porteurs de mutations GATA2

Prise en charge et suivi des patients

L'identification récente de mutations hétérozygotes de *GATA2* dans plusieurs syndromes cliniques différents, ne permet pas à ce jour d'obtenir de consensus international sur la prise en charge de ces patients qui cumulent de multiples pathologies dont certaines menacent leur pronostic vital. Toutefois, en France, en 2013, un groupe d'experts francophones (France et Belgique) en hématologie, immunologie et génétique ont initié des réunions biannuelles afin de discuter aussi bien de la prise en charge des patients que des travaux de recherche dans ce domaine.

Concernant les atteintes infectieuses, compte tenu de la prévalence des atteintes à HPV et à mycobactéries atypiques, une vaccination très précoce contre l'HPV et une prophylaxie contre les mycobactéries environnementales doivent être discutées, et poursuivies post-allogreffe, rejoignant les recommandations américaines. Un traitement anti-infectieux précoce et large sera envisagé pour ces patients qui cumulent un risque viral, bactérien, d'infections mycobactériennes et fongiques. Il est justifié de faire un dosage pondéral des immunoglobulines et des sous classes d'IgG, pour améliorer la réponse immunitaire en vaccinant ou revaccinant ces patients contre le pneumocoque et *Haemophilus*, et éventuellement discuter de substitutions en immunoglobulines ou de prophylaxie par antibiotiques.

Dépistage génétique des patients et apparentés

La reconnaissance de l'ensemble très large des manifestations cliniques associées aux mutations de *GATA2* reste un défi pour les cliniciens et touche de nombreuses spécialités au-delà des immuno-hématologues qu'il convient de sensibiliser : dermatologues, pneumologues, ORL, internistes, infectiologues, rhumatologues, gynécologues et cardiovasculaires. Après confirmation moléculaire, une enquête familiale est nécessaire compte tenu du caractère dominant de la pathologie, de la variabilité des présentations cliniques et implique l'ensemble de la famille, ascendant, fratrie et descendance. Une telle démarche doit être faite dans un cadre multidisciplinaire et comporte une consultation pour conseil génétique en présence d'un généticien, d'un psychologue et de l'hémato-immunologiste référent.

L'enjeu de l'enquête familiale se situe à 2 niveaux: le cas le plus urgent est celui d'un don intrafamilial de cellules souches hématopoïétiques pour allogreffe de moelle. Le statut génétique du donneur potentiel doit être connu le plus rapidement possible afin d'envisager une greffe à partir du fichier si la fratrie est porteuse de la mutation. La normalité de l'hémogramme et l'absence d'anomalies cliniques ne sont pas suffisantes pour exclure le diagnostic, compte tenu de l'existence de porteurs asymptomatiques. La deuxième circonstance est celle de l'étude des cas non symptomatiques dans la famille, avec une acuité particulière pour les mineurs. Quoique l'expérience de la détection des cas asymptomatiques et de leur suivi soit forcément récente, l'avis des participants du groupe de travail est qu'il existe un intérêt médical à connaître le plus tôt possible dans la vie des patients leur statut *GATA2*. L'intérêt d'un tel diagnostic est d'organiser un suivi médical pour dépister les premiers signes d'une atteinte médullaire, d'un déficit immunitaire afin de mettre en place une prophylaxie. Il s'agit bien sûr d'une proposition pour les apparentés qui doivent bénéficier à la fois d'information, de temps et de support psychologique et bien sûr conservent le droit de refuser un dépistage génétique. Devant la gravité d'un tel tableau clinique, se pose aussi la question du diagnostic prénatal pour ces familles. A ce jour, un premier cas de diagnostic prénatal pour mutation de *GATA2* a été organisé (données non publiées).

Prise en charge des complications hématologiques

Lors de la survenue de LAM et/ou de MDS, souvent associées à des anomalies cytogénétiques, l'allogreffe de moelle osseuse apparaît indiquée, y compris avec donneur non apparenté ou unité de sang placentaire, comme cela a été proposé par de nombreuses équipes ^{1,3,4,320,327}. Environ une soixantaine de patients allogreffés ont été rapportés à travers le monde, pour des hémopathies et/ou un déficit immunitaire, avec de bons résultats globaux post allogreffe si l'on prend en compte les motifs immuno-hématologiques ayant motivé la greffe ^{320,327}. Dans la cohorte des 78 patients français, 25 patients ont été allogreffés pour des complications hématologiques sévères (MDS, LAM, LAL, Aplasie médullaire) avec un âge moyen à la greffe de 20 ans (6-63 ans, 8 enfants). Le conditionnement était myéloablatif dans 19 cas (76%), séquentiel dans 5 cas et atténué dans un cas. Les donneurs étaient apparentés pour 3, non apparentés dans 20 cas (6 mismatched) et 2 unités de sang placentaire. 3 ont présenté un rejet de greffe, 52% une GVH grade II-IV,

13 patients ont eu 28 épisodes viraux et 7 fongiques. La survie globale était de 65% avec une médiane de suivi de 2,2 ans (1,1 à 3,8), 81% en situation de cytopénie réfractaire sans excès de blastes et 44% pour les autres. Le lymphoedème et les verrues ne semblent pas corrigés par la greffe ³³⁵. Ces résultats incitent à une allogreffe précoce en situation de cytopénie réfractaire avec un conditionnement myéloablatif à toxicité réduite chez les patients porteurs de mutations *GATA2*.

L'expérience du NIH fait état de 14 patients transplantés pour des raisons essentiellement immunologiques (MonoMAC), présentant souvent des signes de cytopénie réfractaire ou de MDS. Les patients étaient âgés de 15 à 49 ans. Un conditionnement atténué a été utilisé compte tenu du phénotype clinique, les donneurs étaient variables, soit géno-identiques, soit non apparentés (phéno-identiques, haplo-identiques ou unités de sang placentaire). La survie globale était de 57% à 36 mois, soit un peu plus péjorative que dans notre cohorte, avec, chez les survivants, une bonne reconstitution immuno-hématologique mais avec une toxicité non négligeable (65% d'infections dont 3 décès, 57% de GVH grade II-IV). Deux rejets ont été observés, 1 évolution clonale post-allogreffe ^{320,327,334}, motivant notre choix français pour un conditionnement le plus souvent myéloablatif. Parmi les différents types de donneurs, il existait une nette tendance péjorative au dépend des cellules souches de cordons (1 survivant sur 4) et des donneurs haplo-identiques (1 survivant sur 2) par rapport aux donneurs intrafamiliaux et non apparentés parmi lesquels une survie de 75% a été observée (à nuancer compte tenu de l'effectif). Seule la cohorte publiée par l'EWOOG semble retrouver un pronostic lié à la greffe indépendant du statut mutationnel *GATA2*, mais elle comporte un biais important de sélection pédiatrique et de greffe systématique et précoce d'enfants sans comorbidités présentant une MDS ³⁰².

Avant l'allogreffe, la prise en charge hématologique vise à être le plus conservateur possible et à éviter les chimiothérapies intensives, compte tenu des complications infectieuses extrêmement lourdes et fréquentes rencontrées avec des schémas classiques et en particulier l'induction des protocoles usuels de LAM. Une prophylaxie systématique par antibiotiques et IgIV sera proposée chez les patients qui reçoivent une chimiothérapie pour LAM. Le taux d'échec hématologique de ces traitements est de plus inhabituellement élevé. Au cas par cas, l'utilisation de chimiothérapie comportant des agents déméthylants mérite d'être considérée ou une surveillance simple pour les patients ayant un IPSS bas risque (=1),

dans la perspective de proposer au patient une allogreffe dans les meilleures conditions possibles.

La morbi-mortalité excessive associée au traitement intensif des hémopathies malignes et à leur échec fréquent, et les meilleurs résultats de l'allogreffe chez les patients qui n'ont pas d'excès de blastes incite à proposer cette dernière de façon préemptive. Cependant la place de l'allogreffe de CSH préemptive reste discutée car si l'allogreffe permet de corriger le déficit immunitaire et de prévenir le risque d'évolution clonale, le risque de complications précoces potentiellement létales (en particulier infectieuses et liées à la réaction du greffon contre l'hôte (GVH)) doit être considéré et discuté en réunion multidisciplinaire (Club GATA2). Cette question de timing de l'allogreffe de moelle est une question qui reste ouverte et le groupe anglais propose récemment une stratégie identique à la nôtre avec un suivi hématologique rapproché permettant de mieux appréhender l'évolution de la maladie

336

Autres complications

La prise en charge des autres complications repose sur un travail pluridisciplinaire et doit être coordonnée par l'hématologue référent réalisant la surveillance clinique et de l'hémogramme de manière biannuelle. Le traitement des verrues reste parfois complexe, ainsi que des atteintes cutanées souvent résistantes aux corticoïdes.

Article 3, Biologie, en préparation

Hematopoietic functions of R396Q and R204X GATA2 mutants suggest distinct mechanisms leading to the GATA2 syndrome

Pasquet Malène, Lagarde Stéphanie, Prade Naïs, Carrette Alicia, Rouquie Nelly, Hebrard Sylvie, Demur Cécile, Bories Pierre, Donadieu Jean, Broccardo Cyril, Delabesse Eric

Hematopoietic functions of R396Q and R204X GATA2 mutants suggest distinct mechanisms leading to the *GATA2* syndrome

Short title: R396Q and R204X GATA2 mutants' functional analyses

Pasquet Malène^{1,2}, Lagarde Stéphanie^{1,3}, Prade Naïs^{1,3}, Carrette Alicia¹, Rouquie Nelly¹, Hebrard Sylvie¹, Demur Cécile³, Bories Pierre¹, Donadieu Jean⁴, Broccardo Cyril^{1*}, Delabesse Eric^{1,3*}

1. INSERM U1037, team 16, Center of Research of Cancerology of Toulouse, France

2. Department of Pediatric Hematology, Hôpital Purpan, Toulouse, France

3. Hematology laboratory, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

4. French Severe Chronic Neutropenia Registry

* BC and ED contribute equally to this study.

Corresponding author

Pr Eric Delabesse, Hematology laboratory, office N3-LAB-BIO-012, Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse, site Oncopôle, CHU Toulouse, 1 avenue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse cedex 9, Tél : +33 5 31 15 62 29 ; Fax : +33 5 31 15 62 27 ; e-mail : delabesse.eric@iuct-oncopole.fr

Text word count for text:

Abstract word count:

Numbers of figures and tables

Number of references:

Scientific category

Key points

Abstract

Heterogenous germline *GATA2* mutations have been identified in patients and families associated with predisposition to hematological malignancies, immunodeficiencies and vascular diseases. These *GATA2* mutations are genetically various but no correlation with phenotype was identified so far. Since mutations may cause either haplo-insufficiency, a dominant negative effect or add new protein function, we analyzed two specific *GATA2* mutations, R204X leading to a premature stop codon before the first zinc finger and the R396Q a missense mutation located at the end of the second zinc finger. *In vitro* differentiation of hematopoietic progenitors showed that the cells transduced with the *GATA2* R396Q mutant remain blocked at an early stage of granulo-monocytic differentiation. The *GATA2* R204X mutant shows no differential effect compared to cells transduced with wild type *GATA2*. R396Q, unlike R204X, can induce leukemic transformation of cells *in vitro* after serial re-seeding of transduced progenitors. These R396Q cells may be grown in liquid media without cytokines indefinitely, initiating a leukemia cell line. The cellular location of these mutant proteins is distinct, nuclear for the R396Q mutant but cytoplasmic for the R204X mutant by probable loss of the nuclear localization signal. Transcriptomic analyses showed that R396Q mutant has a dramatic distinct expression pattern, the most significant gene upregulated being *Runx1t1*. Thus, our *in vitro* experiments demonstrate that the heterogeneity of the *GATA2* syndrome come from clinical defects but also biological distinct defects, the R204X mutant acting as a loss of function mutation in contrast to the R396Q mutant associated with new protein properties.

Introduction

Since 2011, various *GATA2* mutations have been identified in individuals and families with hematological, immunological and vascular diseases: myelodysplasia and/or acute myeloid leukemia¹⁻⁵, dendritic cells, monocytes and B and NK lymphoid cells deficiency (DMLC deficiency)^{6,7} and Emberger syndrome (myelodysplasia and lymphedema)^{8,9}. Overall survival of these patients is poor, reaching 77% at 40 year-old and 45% at 60 year-old in the NIH cohort, respectively, mainly due to hematological malignancies evolution⁴. As bone marrow transplantation (BMT) remains the only curative treatment, a better understanding of functional consequences of *GATA2* mutations might help to improve the therapeutic modalities. *GATA2* transcription factor plays an important role in the proliferation and differentiation of progenitors and hematopoietic stem cells¹⁰⁻¹². To date, the potential mechanisms of human pathogenesis of *GATA2* mutations remain largely unknown.

Of the 331 patients reported in the literature associated with *GATA2* mutations so far, 177 harbour germinal heterozygous mutations (Supplementary Table 1, Figure 1A). *GATA2* germline mutations are heterogeneous resulting either in complete deletions, frameshift or point mutations. Analysis of the location of these *GATA2* germline mutations according to published reports of 177 patients (Supplemental Table 1, Figure 1A for mutations located inside the reading frame of *GATA2* and 1B for mutations leading to the complete deletion of the *GATA2* gene or specific deletion of the intron 4 enhancer of *GATA2*) indicated that the most frequent mutations are either missense mutations over or immediately C-terminal to the second zinc finger (94/176 cases, 53%, Figure 1A) or a frame-shift or a stop codon before the first zinc finger (29/176, 16%, Figure 1A). The limited published series reported no correlation between genotype and phenotype suggesting a wide spectrum for a syndrome underlying several diseases^{2-4,13}. The initial report by Hahn and colleagues hypothesized a dominant negative effect of the T354M and T355del *GATA2* mutants located in the ZnF2 based on competitive assays¹. It has then been shown that a small deletion in a conserved intronic enhancer element led to decreased transcript levels and attrition of progenitors and hematopoietic stem cells (HSC) in a *Gata2*^{+/-} mouse model^{14,15} (Figure 1B). We published a cohort of patients bearing *GATA2* mutations with phenotypes encompassing DMLC and MDS/AML³. In the present study, we analyzed the hematopoietic functions of two different *GATA2* mutants with distinct clinical phenotype, R204X which leads to a truncated protein missing the two ZnF and R396Q with a non-sense mutation located just after the second ZnF domain.

Methods

GATA2 cloning and mutagenesis

Human *GATA2* coding region was cloned upstream of the internal ribosomal entry sites (IRES) of the MSCV-IRES-EGFP (enhanced green fluorescent) retroviral vector (MIE)¹⁶. *GATA2*-reading frame was mutated using QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. The complete reading frame of *GATA2* was verified by Sanger sequencing.

Retroviral production

Retroviral particles were produced by transfecting AmphoPack 293T cells with pMD2.G envelop vector and the relevant MIE vector (empty [MIE], *GATA2* wild-type [WT], *GATA2* R396Q [R396Q] or *GATA2* R204X [R204X]). Particles were harvested 72h after transfection, filtered with a membrane of 0.45- μ m and stored at -80°C.

Transduction of lineage-negative bone-marrow murine cells, serial replating and long-term culture assays

Bone marrow cells from C57BL/6 8-wk female mice were sorted according to stem cell surface markers (Lin⁻Sca⁺Kit⁺) using autoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). One hundred thousand cells per condition were infected twice with retroviral vector-based particles by centrifugation at 3,000xg for 2 hours at 32°C with 2 μ g Polybrene (Hexadimethrine bromide, 400 μ g/uL) on 2 consecutive days. Infected lineage-negative cells were plated in triplicate in multipotential methylcellulose (MethoCult 3434, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) at 10⁴ cells per dish, and colonies were numbered 10 days later. Aliquots of 10⁴ cells were then re-plated at day 7, 14 and 21. Colony numbering, cytospin and flow cytometry (CD11b [clone M1/70, BD Pharmingen]; CD115 [clone AFS98, eBioscience]; Ly6C [clone AL-21, BD Pharmingen]; Ly6G [clone 1A8, BD Pharmingen]) were done at days 7, 14 and 21. Cytospin preparations were obtained from 10⁵ cells in 150 μ L phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged onto glass slides before May-Grünwald-Giemsa staining. Cell lines derived from R396Q transduction after day 21 were cultured in Stemspan medium (Stem Cell Technologies) with myeloid cytokines (IL3, IL6 and SCF), then progressively transferred to IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium, ThermoFischer Scientific) with 10% fetal bovine serum (FBS) and without cytokines.

Subcellular location of GATA2 mutants

The cell line HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) do not express *GATA2*. HEK293 cells were cultured with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and 10% FBS (Sigma). All cultures contained 50 units/mL of penicillin G and 50 μ g/mL of streptomycin. Transient transfections were

performed using calcium chloride 1M with MIE, WT, R396Q or R204X. After 24h, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 20 min. The cells were permeabilized with 0.5% Triton in PBS for 5 min, and blocked with 5%FBS for 30 min. Cell labelling was performed for 1 hour using rabbit antibody against human N-terminal GATA2 (Abcam Biotechnology, ab173817, 1/100 dilution) then 30 min with Alexa Fluor-647-conjugated goat secondary anti-rabbit antibody (Molecular Probes, 1/800 dilution). Slides were mounted using ProLong antifade reagent medium with 4',6-diaminidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies). Cells without primary anti-GATA2 antibody were used as negative control and HeLa cells expressing GATA2 was used as a positive control. Image acquisition was achieved using inverted wide-field Zeiss Axio Observer Z1 microscope equipped with x40 oil NA 1.3 objective and AxioCam MRm CDD camera. Editing was performed using Image J software packages.

Transcriptome analyses

C57BL/6 8-wk female were treated with 5-fluorouracil (5-FU) at 150mg/kg 6 days prior to bone marrow cell harvesting. The bone marrow cells were infected with MIE, WT and R396Q retroviral particles following the protocol used for lineage negative cells. GFP-positive cells were sorted after 72h of culture. Total RNA was extracted using Rneasy plus MiniKit (Qiagen) and its quality was assessed with the RNA Screen Tape on Agilent 2200 TapeStation Bioanalyzer (Agilent Technologies). RNA samples were purified and prepared according to the manufacturer's protocol using the Affymetrix's GeneChip Whole Transcript Sense Target Labeling Assay Kit (Affymetrix) and hybridized on Affymetrix GeneChip Mouse Exon 1.0 ST arrays. Probe-signal intensities were normalized and summarized using the robust multiarray average (RMA) method with the Affymetrix's Expression Console software. Transcriptome analysis was achieved using SAM (Significance Analysis of Microarrays¹⁷) package run with R software (version 3.3.1., <https://cran.r-project.org/>) with the following parameters: delta value of 5, minimum fold change of 1.4, T-test statistic, 1,000 permutations. The false discovery rates calculated from these settings were 0.005 for MIE vs. WT (190 significant up-regulated probe sets and 164 significant down-regulated probe sets), 0.018 for MIE vs. R396Q (38 significant up-regulated probe sets and 29 significant down-regulated probe sets) and 0 for WT vs. R396Q (151 significant up-regulated probe sets and 151 significant down-regulated probe sets). Overall, 504 probe sets are significantly modified, 500 genes (Hba-a2 being detected through two independent probe sets) and 3 micro-RNA (Mir223, Mir703 and Mir8116). Clustering of these 504 probe sets was performed using dChip 2010 software¹⁸ with the mean divide by the standard deviation, a correlation metric and a centroid linkage method. For Hba-a2, the two probe sets were merged using their mean.

RUNX1T1 qPCR analyses

The RNA quality was assessed using RNA Screen Tape (Agilent Technologies). The cDNA was done using 1 µg of RNA and the SuperScript Vilo kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) in a final volume of 25 µL. A volume of 2 µL of cDNA (160 ng RNA-equivalent) was used for quantitative PCR in a 10 µL final volume using the LightCycler SyBr Green Master Mix kit (Roche). The primers used for quantitative PCR were Runx1t1-F (5'GCA GTA GCA GCA GCC ACT C3') and Runx1t1-R (5'GCA GGC CTG TGA AGG AAT T3') for murine *Runx1t1* and Abl1-F (5'GAG CAG AAA GAT GCG CCT3') and Abl1-R (5'AAG CAG TGG CGA TAC AGC A3') for the murine housekeeping gene *Abl1*. Results were expressed as the ratio of *Runx1t1* to *Abl1* using the Δ CT method.

Results

GATA2 R396Q and R204X mutations

To analyze the functional effects induced by GATA2 mutations, we selected two representative mutants of these two major categories of mutations as models of these main molecular events, the R396Q mutation for the former and R204X mutation for the latter (Figure 1A). We identified initially the R396Q mutation in a woman who developed at the age of 35 an AML. She had a history of recurrent gingivitis and skin infection consistent with chronic neutropenia and monocytopenia. She died from CMV pneumonia without achieving complete remission. She had 3 sons. Her second child developed an AML at 14 years. He had a previous history of recurrent infections and mild neutropenia. His elder brother had also a history of chronic neutropenia, EBV replication in the gut, severe respiratory distress syndrome, immunological tests consistent with DMLC/monoMAC, and a refractory cytopenia with multilineage dysplasia. The youngest brother had a chronic EBV replication in the blood and a neutropenia along with monosomy 7³. Five additional patients were published with this germline mutation associated with clinical presentations of MDS, AML or DMLC/MonoMAC^{19,20}. The germline mutation R204X was identified in a unique patient presenting HPV-induced warts, clinical features of extended sarcoidosis, neutropenia along with DMLC. She developed a disseminated *Mycobacterium avium* complex infection and later an AML³.

GATA2 R396Q but not R204X mutants block the myeloid differentiation

We assessed the impact of these two representative GATA2 mutants on myeloid differentiation by transducing retroviruses expressing these mutants (R204X or R396Q) in murine bone marrow lineage negative cells compared to the empty vector (MIE) or the GATA2 wild-type cDNA (WT). A 3-fold increase in number of myeloid cells was observed at day 10 within the R396Q mutant compared to MIE, WT or the R204X mutant (data not shown). Characterization of these myeloid colonies revealed a specific bias toward CFU-G for the R396Q mutant (5 fold increase compared to MIE) compared to MIE, WT or R204X (Figure 2A). After 10 days of culture, 87% of cells expressed the R396Q mutant (according to the EGFP protein expression) compared to 42% for MIE, 37% for WT and 48% for R204X suggesting a proliferative advantage of the R396Q mutant (Figure 2B). Detailed flow analyses of the EGFP-positive cells confirmed that the ectopic expression of the normal GATA2 protein (WT) is sufficient to block the myeloid differentiation with a drastic reduction of monocytes/macrophages (CD11b⁺CD115⁺ cells from 27% in MIE to 3% in WT) and mature granulocytes (Ly6G⁺ cells from 30% in MIE to 2% in WT) associated with an increase of immature myeloid cells (CD11b⁻CD115⁻ cells, from 15% in MIE to 85% in WT and Ly6G⁻ cells, from 66% in MIE to 94% in WT, Figure 2B). The two GATA2 mutants have intermediate but distinct phenotypes between MIE and WT. R396Q leads to a strong

reduction of monocytes (CD11b⁺CD115⁺ cells, from 27% in MIE to 2% in R396Q) and a lower reduction of mature neutrophils (Ly6G⁺ cells, from 30% in MIE to 9% in R396Q, Figure 2B). The proportion of immature granulocytes was drastically increased in R396Q compared to WT (CD11b⁺CD115⁻ cells, from 11% to 72%, Figure 2B). The R204X mutant has an intermediate phenotype between MIE and WT with a lower proportion of mature monocytes (12% of CD11b⁺CD115⁺ cells) associated with a normal neutrophil differentiation (28% of Ly6G⁻ cells). Cytospin smears confirmed these results with an immature morphology of R396Q transduced cells and a complete absence of mature monocytes (Figure 2C). Thus, the two mutants have a distinct impact on myeloid differentiation. R204X is close but distinct to the phenotype of MIE. In contrast, R396Q is characterized by a specific enrichment of immature granulocytes not seen in WT, due to a cell proliferation associated with an early blockage of neutrophil differentiation.

GATA2 R396Q has transforming properties in contrast to R204X

The transformation abilities of GATA2 mutants were evaluated by serial replating of transduced cells at days 7, 14 and 21 (Figure 3A). At day 7, the number of colonies was similar for MIE, WT, R396Q and R204X. In contrast, at days 14 and 21, the number of colonies was specifically increased for R396Q compared to MIE, WT and R204X, the difference being highly significant at day 21 (Figure 3A). The differential count of colony types at day 14 revealed a drastic bias towards immature myeloid cells (myeloblasts; Figure 3B). R396Q cells were collected after the third replating (day 21) and cultured in a liquid medium with a gradual reduction of the concentration of cytokines. These cultures allowed the establishment of EGFP⁺ cell lines with a cytological presentation of immature granulocytes (CD115⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁻ cells, Figure 3C). The expression pattern of these cell lines was consequently similar to those seen in transduced primary cells (Figure 2B). Taken together, these results showed that R396Q, but not R204X, was able to confer *in vitro* transforming properties to the infected cells.

Subcellular localization of GATA2 R396Q and R204X

The nuclear localization signal sequence (NLS) is necessary to the correct localization of GATA2 in the nucleus and is located just after the second zinc finger (KSKK, amino-acid 405 to 408, Figure 1A), close to the R396Q mutation. We analyzed consequently the sub-cellular location of the GATA2 mutant proteins, as it might be modified in a similar way to NPM1 mutations, leading to a delocalization of the GATA2 mutant protein, but also of proteins binding to it. Transient transfection of HEK293 cells which did not express GATA2 showed that the R396Q mutant protein was located in the nucleus as the WT protein (Figure 4). In contrast, the R204X mutant protein was delocalized in

the cytoplasm, in agreement with the loss of its nuclear localization signal (Figure 4). The mutation of the R396 amino-acid despite its vicinity to the NLS did not affect its subcellular location.

GATA2 R396Q is characterized by a specific over-expression of *Runx1t1*

Due to its nuclear location, we determined the R396Q transcriptome compared to MIE and WT after 4 days of culture after retroviral transduction (Figure 5A). The expression of *Gata2* after transduction of murine bone marrow cells by WT or R396Q were up-regulated 2.8 and 1.9 fold respectively (Figure 5A). WT was able to initiate the expression of markers of the erythroid and megakaryocytic pathways (Figure 5B). Markers of the erythroid differentiation consist in an up-regulation higher than 5 fold of *Add2*, *Epor*, *Gfi1b*, *Hba-a2*, *Klf1*, *Tspan33* and *Znfpm1* [also known as *Fog1*]. Markers of the megakaryocytic differentiation consist in an up-regulation higher than 5 fold of *Gp5* [also known as *Cd42d*], *Itga2b* [*Cd41*] and *Vwf*. These effects were associated with a strong down-regulation of stem-cell markers such as *Alcam*, *Cd34*, *Csf3r*, *Gpr65*, *Lyl1* and *Sell* [L-Selectin].

The transcriptome of R396Q was dramatically different from WT. Few genes were strongly up- or down-regulated compared to MIE (Figure 5B). Only 3 genes were strongly up-regulated higher than 5 fold (*Adam23* [5.6 fold compared to MIE and 5.7 compared to WT], *Mex3b* [6.0 fold compared to MIE and 5.5 compared to WT] and *Runx1t1* [also known as *Eto* or *Mtg8*, 11.5 fold compared to MIE and 10.5 compared to WT]). R396Q was unable to enhance the expression of erythroid or megakaryocytic markers (Figure 5A). *Runx1t1* belongs to a family of transcriptional corepressors interacting with *Ncor1* and *Ncor2* (*Smrt*)²¹. The specific up-regulation of *Runx1t1* after GATA2 R396Q transduction was verified using quantitative PCR (Figure 6). These results suggest that the transforming properties of the GATA2 R396Q mutant might be mediated through the specific up-regulation of *Runx1t1*.

Discussion

Understanding the physiopathology of germline heterozygous GATA2 mutations in leukemic transformation remains a scientific and therapeutic challenge since this familial disease displays a diverse clinical pattern and currently relies on BMT as a curative treatment. The absence of clear correlation between genotype and phenotype argues in favor of distinct functional roles of GATA2 mutants. Understanding the GATA2 function in hematopoiesis has evolved since the first observation of early embryonic lethality by E10.5 due to primitive hematopoietic failure by reducing proliferation and/or survival of HSC^{10,22}. Generation of *Gata2* heterozygous mutant mice clearly demonstrated a quantitative reduction in HSC number and compromised HSC function in competitive BM reconstitution experiments^{23,24}. Recently, the disruption of a *GATA2* cis-element located of the +9.5 site, which is occupied by GATA2 and TAL1, showed crucial function for establishment of the murine hematopoietic stem/progenitor cell compartment in the fetal liver, mimicking human MonoMAC disease^{14,15}.

Little is known regarding the role of GATA2 mutations in leukemogenesis in humans. So far, 54 different germline GATA2 mutations have been reported (Supplemental Table 1) and most families display mutations which are located in the C-terminal ZnF domain, among them is R396Q mutation. Herein, we demonstrated in this study that R396Q GATA2 mutant is able to generate full leukemic transformation in progenitors and HSC in an in vitro myeloid assay. Cytospins confirmed the immature blastic phenotype which could be characterized more precisely by FACS: the vast majority of cells retain an early hematopoietic phenotype, consistent with immature granulocytic and monocytic cells. Moreover, we were able to grow a leukemic lineage independently from growth factors, which has cytologic and immunologic clonal characteristics. Only one recent study²⁰ also focused on R396Q GATA2 mutation, demonstrating that it could disrupt autoregulatory loop of *GATA2* promoter activation, decrease protein level and may act as a loss of function mutation. The authors proposed an additional putative dysregulation of specific GATA2 targets by mutated protein, based on differential gene expression level. However, the functional analyses remained incomplete. Our study showed that all the CFU-G cells produced are completely immature with leukemic transformation, which provides a better understanding in leukemogenesis of the disease.

Our results also confirmed that nuclear location of GATA2 is not disrupted in R396Q mutant protein. We could hypothesize that R396Q mutant probably acts by disrupting the interaction with other transcription factors rather than a loss of function mutant only. R396Q mutant showed differential gene expression, which mainly consisted of the up-regulation of transcription factor RUNX1T1 (ETO), confirming that this mutant is likely to affect expression of downstream targets involved in leukemic

transformation. Analysis of the AML1-ETO fusion protein demonstrated that ETO is involved in leukemogenesis through its activity of co-repressor²⁵. Chip-seq and transcriptional profiling have proven cross-regulatory interaction between *GATA2* and *ETO* gene, along with TAL1 and GATA1 complex²⁶. The first report exploring the function of 2 mutants located on the ZnF domain (T354M and T355del) by competitive assays speculated a dominant negative effect of these mutants¹. Such assumption could apply to our model, as well as residual function of mutant protein. Haplo-insufficiency cannot be excluded with our model as the mutation is thought to impair protein-protein interaction and DNA binding.

In this study, the second *GATA2* mutant R204X, retains normal hematopoiesis differentiation, without in vitro leukemic ability. We showed that this mutant, which gives rise to a premature stop codon, may generate a severe truncated protein that remains in the cytoplasm, probably because of the loss of nuclear location signal. In this case, haplo-insufficiency is the main consequence, with impair nuclear binding of the severe truncated protein retained in the cytoplasm. Related to clinical symptoms, these observations could explain the earliest hematological symptoms and malignancies in our family with R396Q mutation (the boy with MDS and monosomy 7 was only 6 at the diagnosis), as compared to the woman with R204X mutation who had a long past history of warts and MonoMAC disease before developing leukemia when adult³. In this case haplo-insufficiency could lead to same results as hemizygozity due to whole or large gene deletion, with dosage effect on target *GATA2* gene. Our hypothesis was that *GATA2* mutation could act as a pre-leukemic event followed by overt transformation due to loss of somatic genes.

Acknowledgments

We are thankful to the patients and their families for their participation in this study. We thank the critical help of the Société Française des Cancers de l'Enfant and the associations 111 des Arts and Laurette-Fugain for their constant support in this work.

Authorship contributions

Contribution: MP, JD and ED provide DNA samples and clinical information. MP, PB, CB and ED designed the research and analyzed results. MP, SL, NP, AC, NR, SH and CB performed experiments. CD reviewed blood and bone marrow slides. MP, CB and ED wrote the paper.

Conflict of interest disclosures

The authors declare no competing financial interests.

Figure Legends

Figure 1

Location of germline *GATA2* mutations in 177 patients (see supplementary Table 1 for details). A. Location of mutations affecting the reading frame of *GATA2* according to their consequences (frameshift, non-sense or missense) and locations (before the two zinc fingers [Pre-Znf, 29 mutations], over the first zinc-finger [Znf1, 4], between the two zinc fingers [Inter-Znf, 15], over the second zinc finger [Znf2, 60] and after the second zinc finger [Post-ZnF, 34]). 5 patients have mutations located over the splice sites and 10 have two *GATA2* mutations. Location of the *GATA2* R204X and R396Q mutations are detailed. B. *GATA2* mutations affecting the expression of the whole *GATA2* locus either by mutation of its enhancer (12 patients) or complete *GATA2* deletion (7 patients).

Figure 2

GATA2 R204X and R396Q mutants effects on myeloid *in vitro* differentiation of lineage negative cells. A. Lin⁻Sca⁺Kit⁺ murine stem cells were infected by *GATA2* WT, R204X and R396Q retrovirus. Infected cells were plated in multipotential methylcellulose at 10⁴ cells per dish. Colonies were counted after 10 days of culture. Colony numbers were normalized according to the empty retrovirus (MIE=1). This figure shows representative data from triplicate experiments. BFU-E, Burst Forming Unit Erythroid colonies; CFU-M, Colony Forming Unit Macrophage colonies; CFU-G, Colony Forming Unit Granulocyte colonies; CFU-GM: Colony-Forming Unit Granulocyte-Macrophage; CFU-GEMM: Colony Forming Unit with Granulocytes, Erythrocytes, Macrophages and Megakaryocytes *= p<0.05. B. Cells from methylcellulose at day 10 showing immature myeloid cells in R396Q mutant compared to normal hematopoiesis in MIE, WT or R204X mutant. C. FACS analysis of GFP-positive cells recovered from methylcellulose at D10. Left panel shows the GFP fluorescence and the gate used to analyze cells expressing the retrovirus. Central panel present the monocytic differentiation using CD11b and CD115. Right panel present the granulocytic differentiation using Ly6G and Ly6C.

Figure 3

Serial replating of *GATA2* mutants. A. Serial replating of transduced Lin⁻Sca⁺Kit⁺ at day 7, 14 and 21. This figure shows representative data from triplicates. *p<0,05. D=day, CFU=colony forming unit. B. Colonies distribution of replated cells at day 7, 14 and 21. This figure shows representative data from triplicates. **p<0,01. C. *GATA2* R396Q cell line recovered after day 21 days. May-Grünwald-Giemsa staining. Left panel shows the GFP fluorescence and the gate used to analyze cells expressing the

retrovirus. Central panel present the monocytic differentiation using CD11b and CD115. Right panel present the granulocytic differentiation using Ly6G and Ly6C.

Figure 4

Subcellular location of GATA2 wild-type and mutants. Immunofluorescence microscopy of HEK293 cells 48h after transient transfection of cells with MIE, WT, R396Q and R204X retroviruses. Scale bars are indicated on the lower right corner.

Figure 5

Transcriptome of GATA2 R396Q mutant. A. Heat map of the significantly differentially expressed genes according to SAM between MIE, WT and R396Q (3 replicates per condition). Locations of major genes are indicated. Red: over-expression; blue: down-expression. B. List of the strongest differentially expressed genes (more than 5 fold). GATA2: genes differentially expressed between MIE and both WT and R396Q (Common Up: genes up-regulated in WT and R396Q compared to MIE, Common Down: genes down-regulated in WT and R396Q compared to MIE). GATA2 WT: genes differentially expressed specifically in WT (Erythroid Up: genes up-regulated associated with an erythroid phenotype; Mega Up: genes up-regulated associated with a megakaryocytic phenotype; Stem cells Down: genes down-regulated associated with a stem cell phenotype; Other Up: genes up-regulated not associated with an erythroid or a megakaryocytic phenotype; Other Down: genes down-regulated not associated with a stem cell phenotype). GATA2 R396Q: genes up- (Up) or down-regulated (Down) specifically in R396Q compared to MIE and WT.

Figure 6

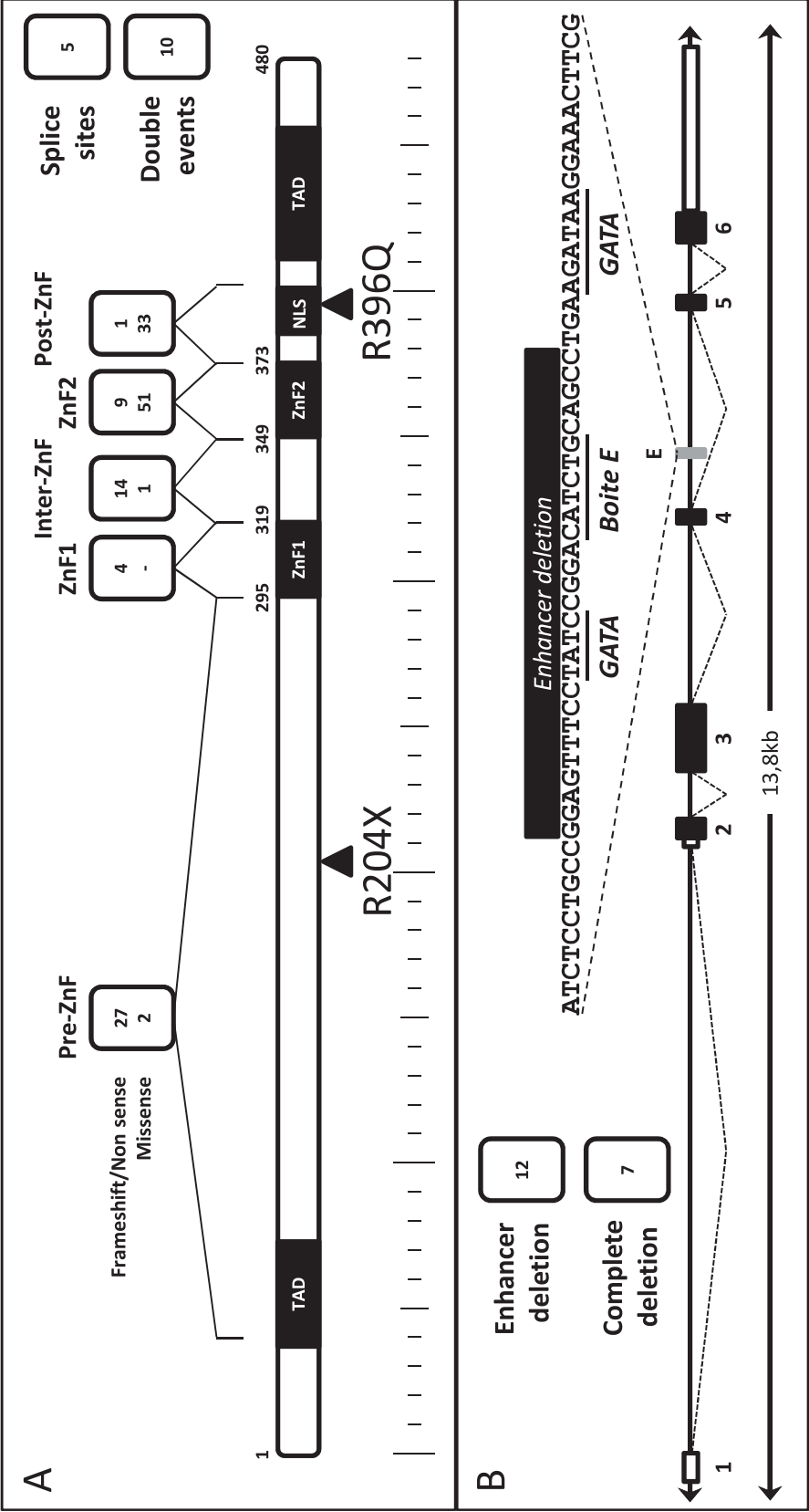
Expression of *Runx1t1* assessed by quantitative RT-PCR.

References

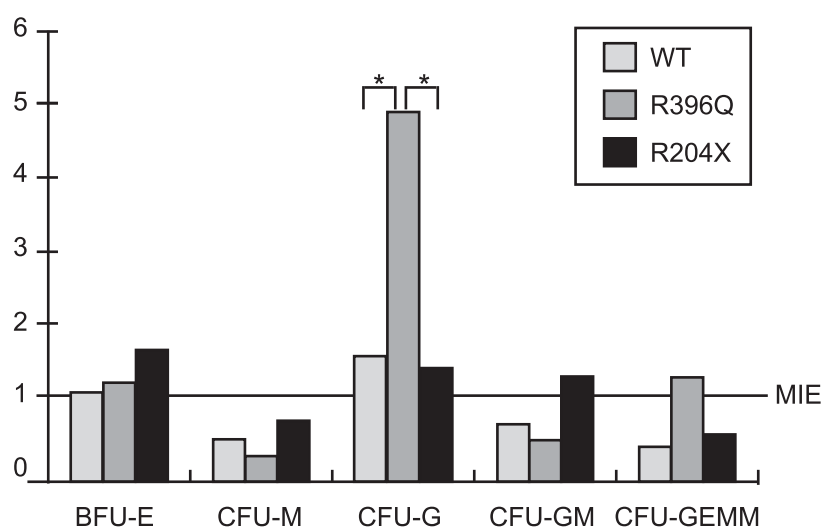
1. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2011;43(10):1012-1017.
2. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood.* 2011;118(10):2656-2658.
3. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(5):822-829.
4. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood.* 2014;123(6):809-821.
5. Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol.* 2015;169(2):173-187.
6. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood.* 2011;118(10):2653-2655.
7. Bigley V, Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2011;96(8):1081-1083.
8. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet.* 2011;43(10):929-931.
9. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood.* 2012;119(5):1283-1291.
10. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* 1994;371(6494):221-226.
11. Labbaye C, Valtieri M, Barberi T, et al. Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2346-2358.
12. Rodrigues NP, Boyd AS, Fugazza C, et al. GATA-2 regulates granulocyte-macrophage progenitor cell function. *Blood.* 2008;112(13):4862-4873.
13. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood.* 2016;127(11):1387-1397; quiz 1518.
14. Lim KC, Hosoya T, Brandt W, et al. Conditional Gata2 inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *J Clin Invest.* 2012;122(10):3705-3717.
15. Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest.* 2012;122(10):3692-3704.
16. Du C, Redner RL, Cooke MP, Lavau C. Overexpression of wild-type retinoic acid receptor alpha (RARalpha) recapitulates retinoic acid-sensitive transformation of primary myeloid progenitors by acute promyelocytic leukemia RARalpha-fusion genes. *Blood.* 1999;94(2):793-802.
17. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(9):5116-5121.
18. Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol.* 2001;2(8):RESEARCH0032.
19. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica.* 2014;99(2):276-281.
20. Cortes-Lavaud X, Landecho MF, Maicas M, et al. GATA2 germline mutations impair GATA2 transcription, causing haploinsufficiency: functional analysis of the p.Arg396Gln mutation. *J Immunol.* 2015;194(5):2190-2198.
21. Zhang J, Hug BA, Huang EY, et al. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. *Mol Cell Biol.* 2001;21(1):156-163.
22. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood.* 1997;89(10):3636-3643.
23. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, et al. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2004;200(7):871-882.

24. Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, et al. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood*. 2005;106(2):477-484.
25. Davis JN, McGhee L, Meyers S. The ETO (MTG8) gene family. *Gene*. 2003;303:1-10.
26. Fujiwara T, O'Geen H, Keles S, et al. Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell*. 2009;36(4):667-681.

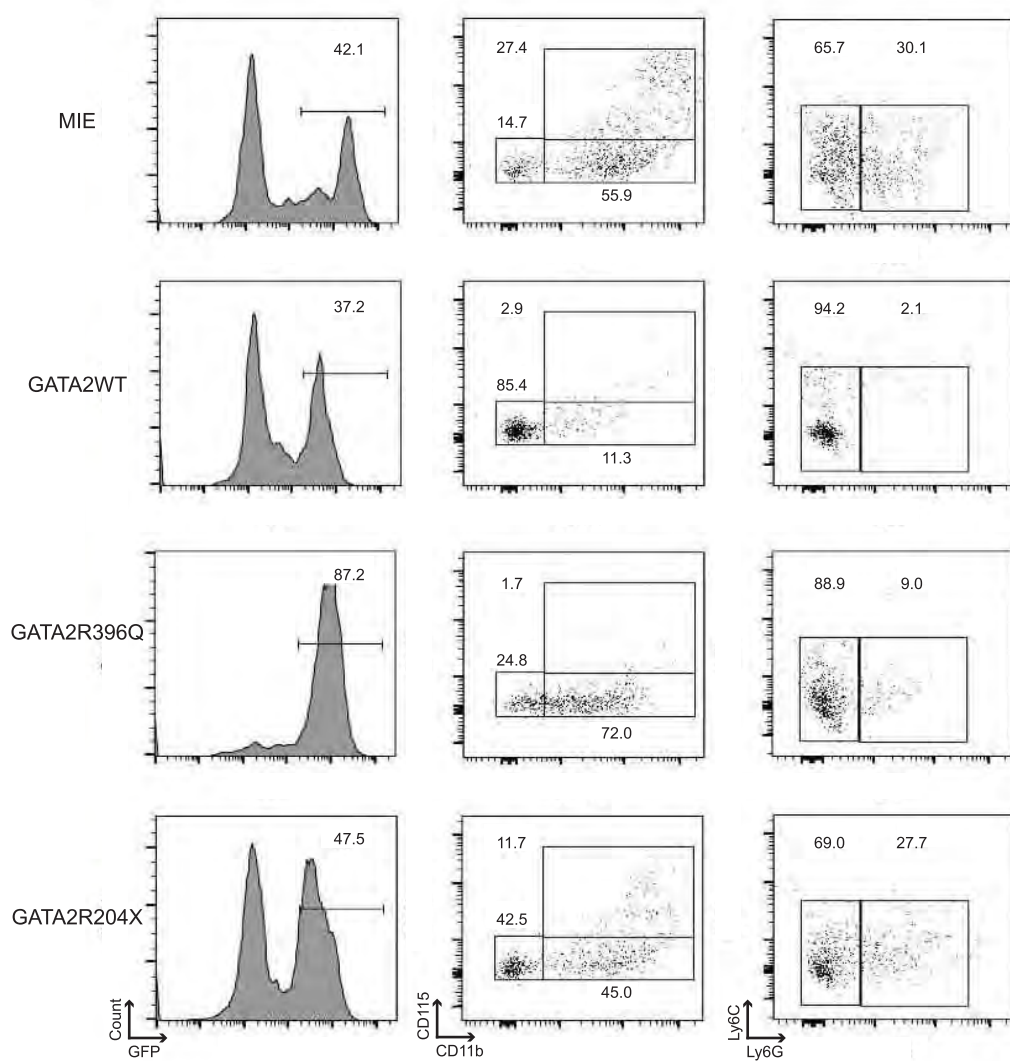
Figure 1



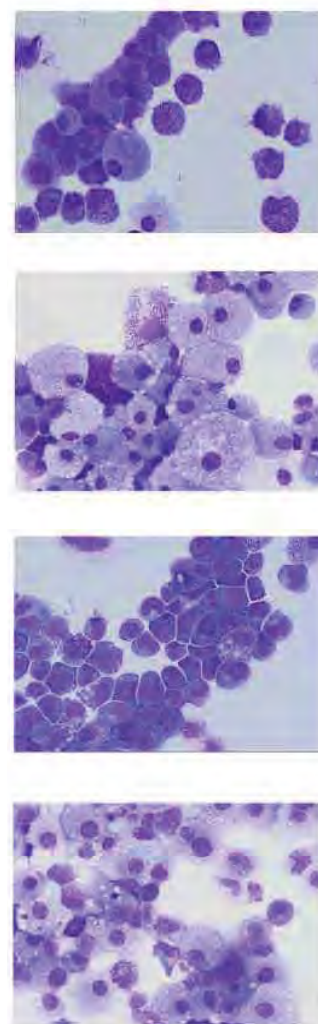
A



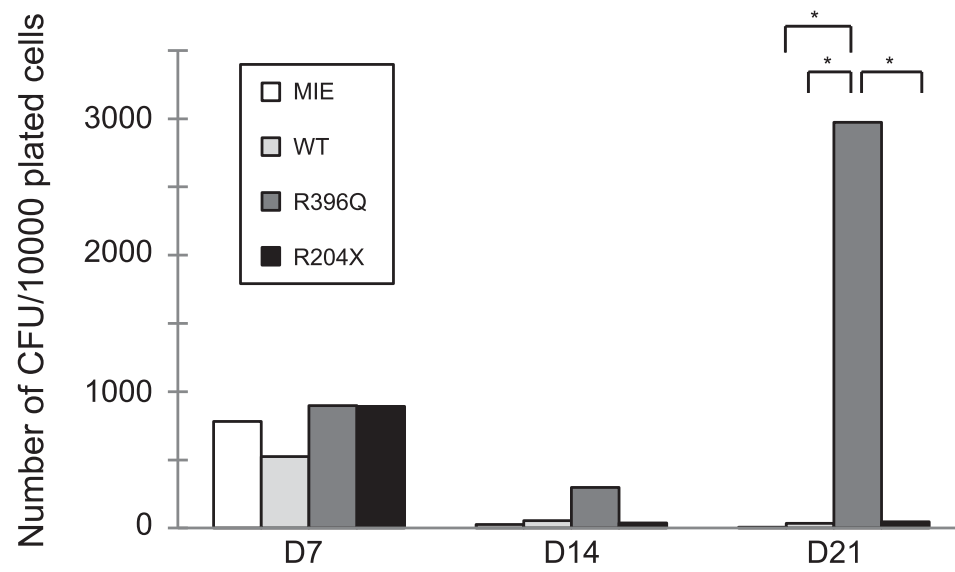
B



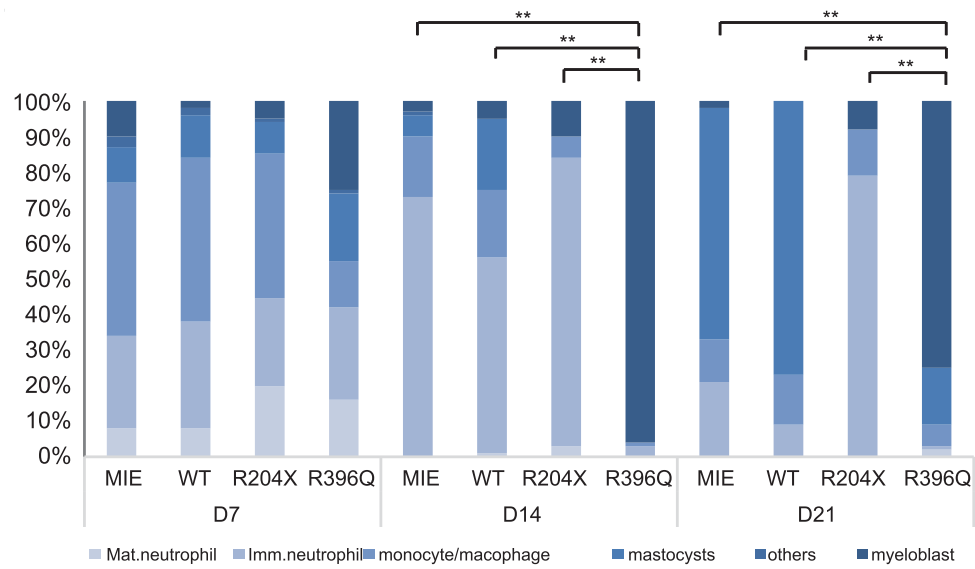
C



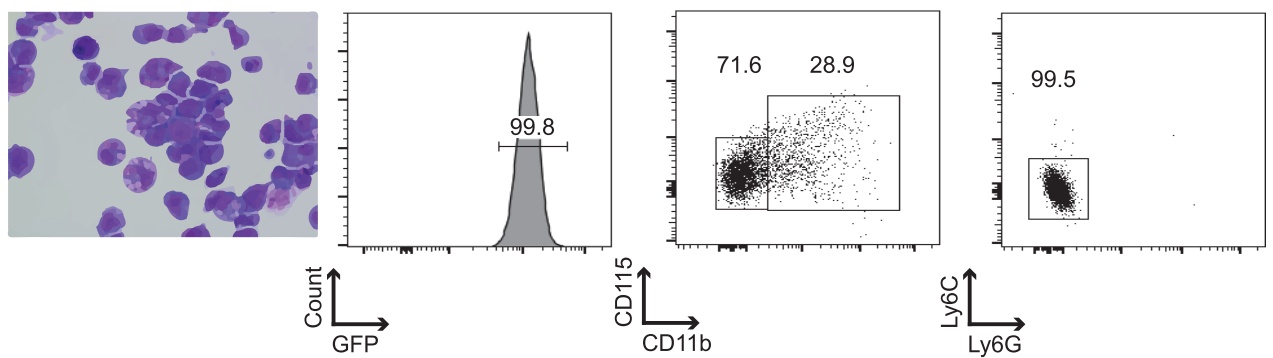
A



B



C



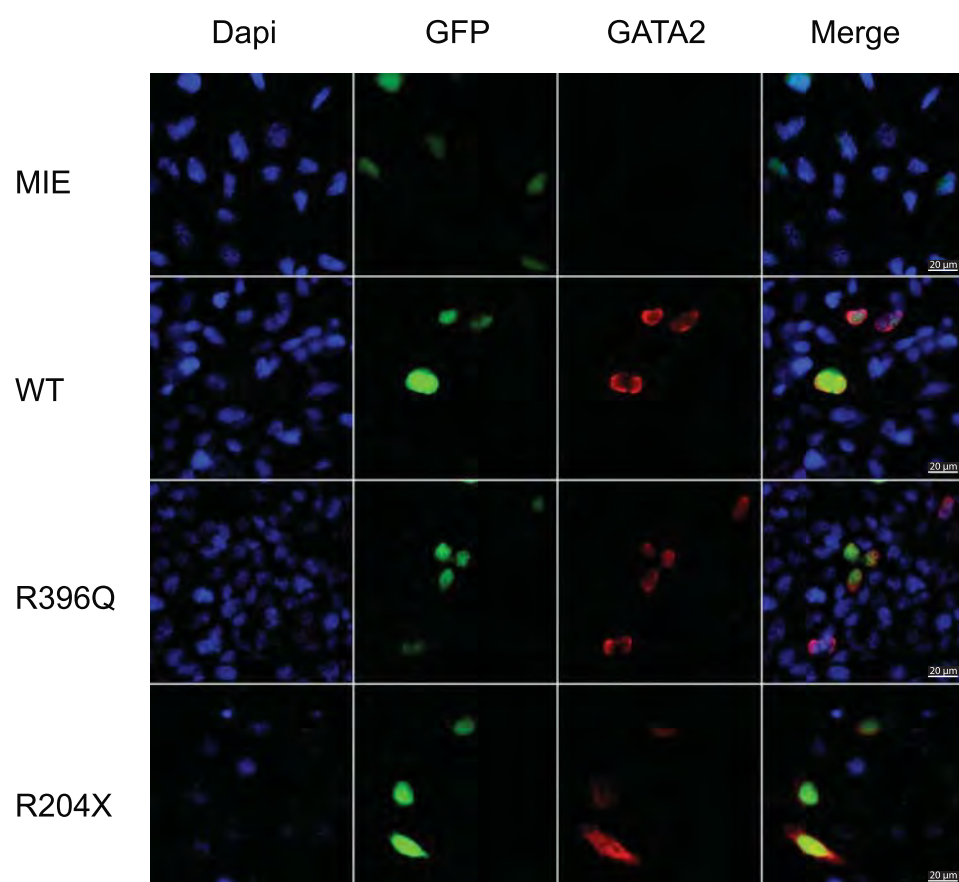


Figure 5

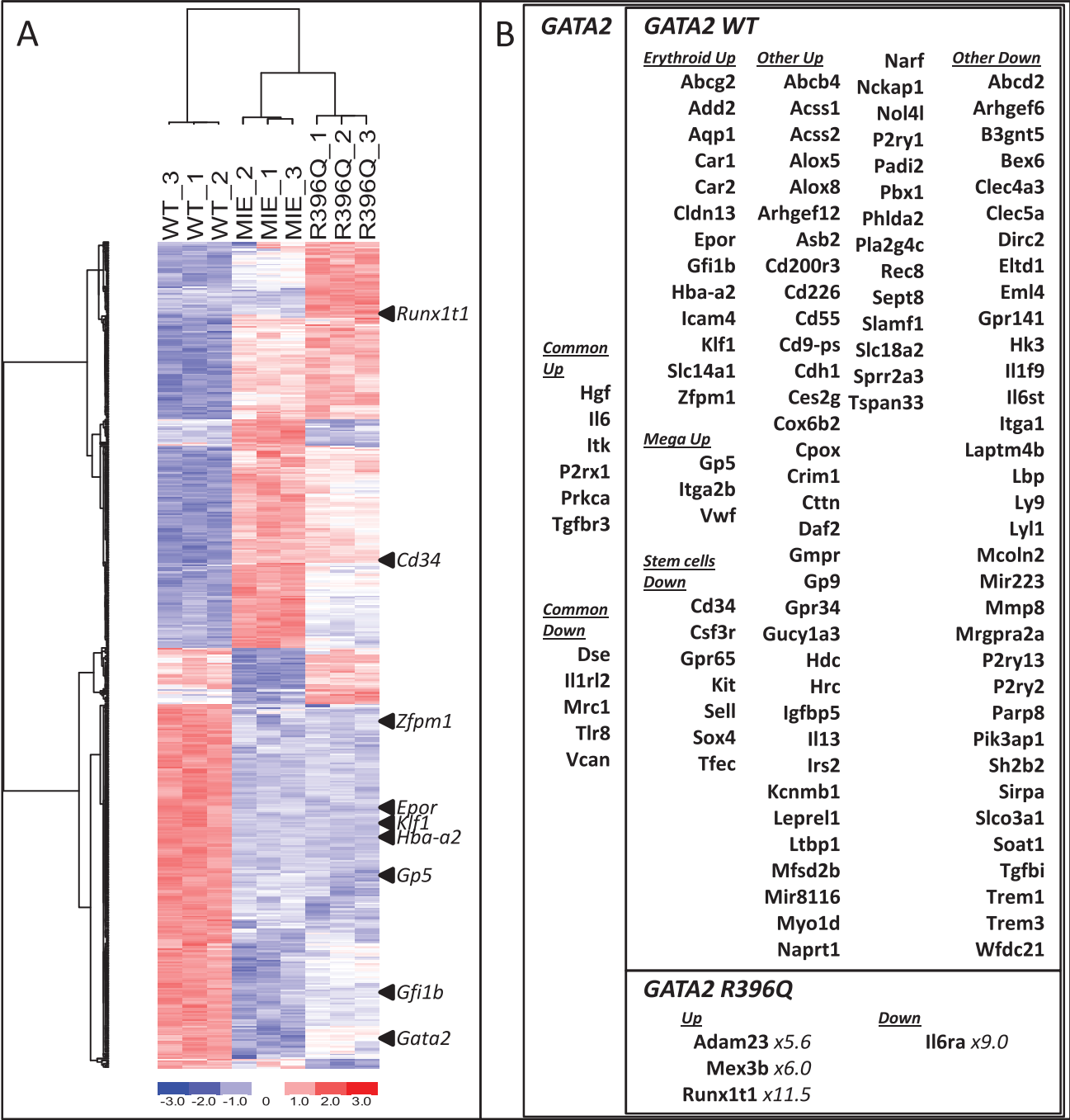
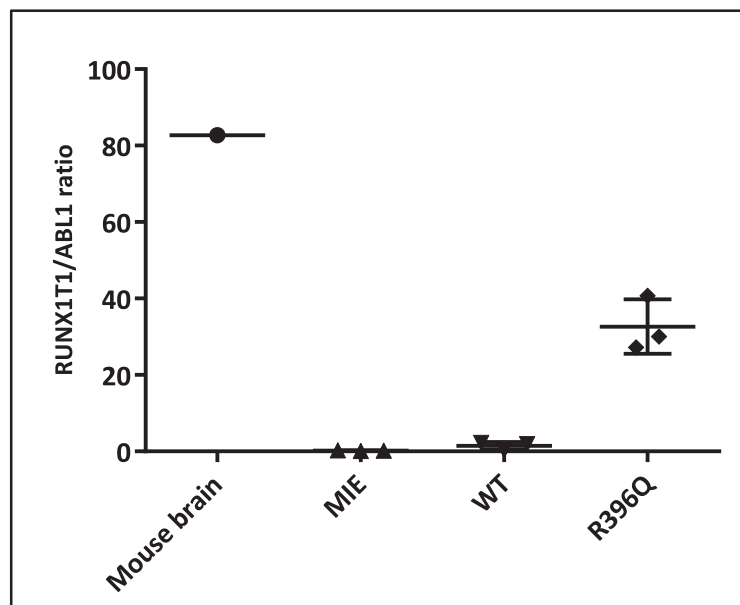


Figure 6



Reference	Year	Patient Id	Lymphoedema	MDS/AML	Infection	Other features	DNA mutation	Protein mutation	GATA2 codon	Mutation type	Consequences
Callier, P. et al., Detection of a	2009 1		No	Yes	No	Mental retardation	6.9 Mb interstitial	No protein	Deletion	Deletion	Complete deletion
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P2-I-2		Yes	No	No		c.230-1_230insC	R78Pfs		78 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P2-II-1		Yes	No	No	Bilateral cleft lip an	c.230-1_230insC	R78Pfs		78 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P2-II-2		Yes	Yes	Yes		c.230-1_230insC	R78Pfs		78 Frameshift	PreZnf (1-259)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 8-I-1		No	Yes	Yes		c.243_244delAinsG	G81fs		81 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P1-II-1		Yes	No	No		c.310_311insCC	L105Pfs		105 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P1-II-4		Yes	Yes	Yes		c.310_311insCC	L105Pfs		105 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P1-III-1		Yes	Yes	No		c.310_311insCC	L105Pfs		105 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P1-III-3		Yes	Yes	No		c.310_311insCC	L105Pfs		105 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P1-III-4		No	No	No	Unilateral ptosis	c.310_311insCC	L105Pfs		105 Frameshift	PreZnf (1-259)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P8-I-1		Yes	Yes	No		c.579_580insA	A194Sfs		194 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. Exome se	2011 1		No	No	Yes		c.599_600insG	G200fs		200 Frameshift	PreZnf (1-259)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 23		Not specified	Not specified	Not specified		c.751C>T	P254L		254 Missense	PreZnf (1-259)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 20		Not specified	Not specified	Not specified		c.778_779ins10bp	D259fs		259 Frameshift	PreZnf (1-259)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 22		Not specified	Not specified	Not specified		c.951_952ins11bp	N317fs		317 Frameshift	Znf1 (293-321)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P3-I-1		Yes	Yes	No		c.1009C>T	R337X		337 Non sense	InterZnf (328-342)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P5-I-1		Yes	No	Yes	sensorineural hear	c.1018-3_1031del	A341Rfs		341 Frameshift	InterZnf (328-342)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P4-I-1		Yes	Yes	No	Sensorineural hear	c.1019_1022del	CGA341Pfs		341 Frameshift	InterZnf (328-342)
Dickinson, R. E. et al. Exome se	2011 2		No	No	Yes		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P1-III-4		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P1-III-5		No	No	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P1-III-8		No	No	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P1-III-9		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P1-IV-1		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P1-IV-2		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P2-II-4		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P2-II-6		No	No	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P2-III-4		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-II-2		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-II-9		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-III-1		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-III-4		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-III-6		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-III-9		No	No	Yes		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-IV-1		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P3-IV-5		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 17		Not specified	Not specified	Not specified		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 19		Not specified	Not specified	Not specified		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 5-II-1		No	Yes	Yes		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P4-II-2		No	Yes	No		c.1063_1065del	AC T355del		355 Deletion	Znf2 (354-373)
Hahn, C. N. et al. Heritable GA	2011 P4-III-1		No	Yes	No		c.1063_1065del	AC T355del		355 Deletion	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 12-I-1		Not specified	Not specified	Not specified		c.1083_1094del	12 R361del	IRNAN	361 Deletion	Znf2 (354-373)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P7-I-1		Yes	No	Yes	sensorineural hear	c.1082G>C	R361L		361 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 10-I-1		Not specified	Not specified	Not specified		c.1113C>G	N371K		371 Missense	Znf2 (354-373)
Ostergaard, P. et al. Mutation:	2011 P6-I-1		Yes	Yes	Yes		c.1117T>C	C373R		373 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 15-II-1		Not specified	Yes	Yes		c.1186C>T	R396W		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 18		Not specified	Not specified	Not specified		c.1187G>A	R396Q		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. Exome se	2011 3		No	No	Yes		c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 21		Not specified	Not specified	Not specified		c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 1-I-1		No	Yes	Yes	Leiomyosarcoma EB	c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 1-II-5		No	Yes	Yes		c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 2-I-3		No	Yes	Yes		c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 3-I-1		Not specified	Not specified	Not specified		c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 9-II-1		Not specified	Not specified	Not specified		c.1192C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. Exome se	2011 4		No	No	Yes		c.1018-1G>T	del340-381	340-381	Splice	Splice Site
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 24		Not specified	Not specified	Not specified		c.1018-1G>A	del340-381	340-381	Splice	Splice Site
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 13-I-2		No	Yes	Yes		c.1-200_871 + 527 M1del	290	Deletion	Deletion	Complete deletion
Hsu, A. P. et al. Mutations in G	2011 13-II-1		No	Yes	Yes		c.1-200_871 + 527 M1del	290	Deletion	Deletion	Complete deletion
Holme, H. et al. Marked genet	2012 12		No	Yes	No		c.121C>G	P41A		41 Missense	PreZnf (1-259)
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 7		Yes	Yes	No		c.992_993ins	GACC L332Tfs		332 Frameshift	InterZnf (328-342)
Bödör, C. et al. Germ-line GAT	2012 III-5		No	1061C>T	T354M					354 Missense	Znf2 (354-373)
Bödör, C. et al. Germ-line GAT	2012 III-7		No	1061C>T	T354M					354 Missense	Znf2 (354-373)
Bödör, C. et al. Germ-line GAT	2012 IV-1		No	1061C>T	T354M					354 Missense	Znf2 (354-373)
Bödör, C. et al. Germ-line GAT	2012 IV-10		No	1061C>T	T354M					354 Missense	Znf2 (354-373)
Bödör, C. et al. Germ-line GAT	2012 IV-6		No	1061C>T	T354M					354 Missense	Znf2 (354-373)
Holme, H. et al. Marked genet	2012 26		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 1		No	Yes	Yes		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 2		No	Yes	No		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 3		No	Yes	Yes		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Holme, H. et al. Marked genet	2012 23		No	Yes	No		c.1187G>A	R396Q		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 10		No	Yes	Yes		c.1-200_871 + 527 M1del	290	Deletion	Deletion	Complete deletion
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 4		No	Yes	Yes		large deletion	No protein	Deletion	Deletion	Complete deletion
Kazenwadel, J. et al. Loss-of-fu	2012 6		Yes	Yes	Yes		large deletion	No protein	Deletion	Deletion	Complete deletion
Mace, E. M. et al. Mutations ir	2013 7		No	Yes	Yes		c.302delG	G101Afs		101 Frameshift	PreZnf (1-259)
Mace, E. M. et al. Mutations ir	2013 8		No	No	Yes		c.417dupT	V140Cfs		140 Frameshift	PreZnf (1-259)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 27-I-1		No	No	Yes		c.586_593dup	G199fs		199 Frameshift	PreZnf (1-259)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P5-II-1		No	Yes	Yes		c.610C>T	R204X		204 Non sense	PreZnf (1-259)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P6-II-2		No	No	Yes		c.670G>T	E224X		224 Non sense	PreZnf (1-259)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 22-I-1		No	Yes	Yes		c.941_951dup	A318fs		318 Frameshift	Znf1 (293-321)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P4-II-2		No	No	No		c.988C>T	R330X		330 Non sense	InterZnf (328-342)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P4-III-1		No	Yes	Yes		c.988C>T	R330X		330 Non sense	InterZnf (328-342)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P4-III-2		No	Yes	Yes		c.988C>T	R330X		330 Non sense	InterZnf (328-342)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P4-III-3		No	No	Yes		c.988C>T	R330X		330 Non sense	InterZnf (328-342)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 41-I-1		No	Yes	Yes		c.1009C>T	R337X		337 Non sense	InterZnf (328-342)
Mace, E. M. et al. Mutations ir	2013 1		No	No	Yes		c.1025_1026ins	GCA342Gfs		342 Frameshift	InterZnf (328-342)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 5-II-1		No	Yes	Yes		c.1061C>T	T354M		354 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 37-I-1		No	Yes	Yes		c.1081C>T	R361C		361 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 33-III-3		No	No	No		c.1099insG + c.1-2	D367fs		367 Frameshift	Znf2 (354-373)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P2-II-1		No	Yes	Yes		c.1114G>A	A372T		372 Missense	Znf2 (354-373)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 30-I-1		No	No	No		c.1163T>C	M388T		388 Missense	Post Znf2 (379-398)
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 30-II-1		No	No	Yes		c.1163T>C	M388T		388 Missense	Post Znf2 (379-398)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P3-II-2		No	Yes	Yes		c.1162A>G	M388V		388 Missense	Post Znf2 (379-398)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P3-III-3		No	Yes	Yes		c.1162A>G	M388V		388 Missense	Post Znf2 (379-398)
Camargo, J. F. et al. MonoMAI	2013 Not specified		No	Yes	Yes		c.1186C>T	R396W		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P1-II-4		No	Yes	Yes		c.1187G>A	R396Q		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P1-III-2		No	Yes	Yes		c.1187G>A	R396Q		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P1-III-3		No	Yes	Yes		c.1187G>A	R396Q		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P1-III-5		No	Yes	Yes		c.1187G>A	R396Q		396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Mace, E. M. et al. Mutations ir	2013 6		No	No	Yes		c.1186C>T	R398W		398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 Index		Not specified	Yes	Yes		Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 II-9		Not specified	Yes	Not specified	-7, LNH	Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 Paternal grandmother		Not specified	Yes	Not specified		Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 II-1		Not specified	No	Yes	Histiocytose X	Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 II-8		Yes	Not specified	Yes		Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 III-2		Not specified	Yes	Not specified		Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Mutsaers, PGJN et al. Highl	2013 III-8		Not specified	Yes	Not specified		Not specified	H26P + G28fs	26 + 28	Frameshift	Double
Pasquet, M. et al. High frequ	2013 P7-II-1		No	Yes	Yes		Chr3:128.17-128.2	No protein	Deletion	Deletion	Complete deletion
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 6-I-1		Yes	Yes	Yes		c.1017+512del	28	Enhancer		

Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 4-I-1	No	No	No	CMML	c.1017+572C>T	Enhancer	Enhancer	Enhancer deletion
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 4-II-1	No	Yes	Yes		c.1017+572C>T	Enhancer	Enhancer	Enhancer deletion
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 4-II-5	No	Yes	Yes		c.1017+572C>T	Enhancer	Enhancer	Enhancer deletion
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 4-III-2	No	No	No		c.1017+572C>T	Enhancer	Enhancer	Enhancer deletion
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 4-III-3	No	No	No		c.1017+572C>T	Enhancer	Enhancer	Enhancer deletion
Mace, E. M. et al. Mutations in	2013 3	No	No	Yes		c.1017+572C>T	Enhancer	Enhancer	Enhancer deletion
Hsu, A. P. et al. GATA2 haploir	2013 33-II-1	No	No	No		c.1-276T>G	Not specified	Not specified	Not specified
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 11.1.1	No	Not specified	No	Auto-immunity, -7	c.257_258delG	C85fs	85 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 7.1.1	No	No	Yes	Lung	c.318_319insT	S106fs	106 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 7.1.1	Yes	No	Yes	cervical intra-epithelial	c.318_319insT	S106fs	106 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 6.1.1	Yes	No	Yes	Auto-immunity, lun	c.594delG	G199fs	199 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 6.1.1	No	Yes	No		c.594delG	G199fs	199 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 6.1.2	No	No	Yes		c.594delG	G199fs	199 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 14.1.1	No	Not specified	No	Auto-immunity, lun	c.599_600insG	G200fs	200 Frameshift	PreZnf (1-259)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 13.1.1	No	No	Yes		c.735_736insC	P245fs	245 Frameshift	PreZnf (1-259)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 44	Not specified	Yes	Not specified		c.793_802del10	F265fs	265 Frameshift	PreZnf (1-259)
Fujiwara, T. et al. Identification	2014 Not specified	Not specified	Yes		Immunodeficiency	c.988C>T	R330X	330 Non sense	InterZnf (328-342)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 30	Not specified	Yes	Not specified +8		c.988C>T	R330X	330 Non sense	InterZnf (328-342)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 31	Not specified	Yes	Not specified +8		c.988C>T	R330X	330 Non sense	InterZnf (328-342)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 34	Not specified	Yes	Not specified -7		c.988C>T	R330X	330 Non sense	InterZnf (328-342)
Shiba N. et al. Mutations of th	2014 No.2	Not specified	Yes	Not specified	M0, 45,XX,add(3)(p	G>A	A342T	342 Missense	InterZnf (328-342)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 9.11.1	No	Yes	Yes	Lung	c.1061C>T	T354M	354 Missense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 9.11.2	No	No	Yes		c.1061C>T	T354M	354 Missense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 9.11.3	No	No	No		c.1061C>T	T354M	354 Missense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 9.11.4	No	No	No		c.1061C>T	T354M	354 Missense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 9.11.5	No	Not specified	No	Auto-immunity, +8	c.1061C>T	T354M	354 Missense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 15.1.1	Yes	Yes	Yes	Auto-immunity, cer	c.1081C>T	R361C	361 Missense	Znf2 (354-373)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 48	Not specified	Yes	Not specified		c.1082G>A	R361H	361 Missense	Znf2 (354-373)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 23	Not specified	Yes	Not specified ASXL1		c.1099inG	D367fs	367 Frameshift	Znf2 (354-373)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 24	Not specified	No	Not specified monocytopenia		c.1099inG	D367fs	367 Frameshift	Znf2 (354-373)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 42	Yes	Yes	Not specified ASXL1, -7		c.1099C>T	R367X	367 Non sense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 10.1.1	No	No	Yes	Lung	c.1114G>A	A372T	372 Missense	Znf2 (354-373)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 20	Not specified	Yes	Not specified -7		c.1116_1130del15	C373del5	373 Deletion	Znf2 (354-373)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 21	Not specified	Yes	Not specified		c.1116_1130del15	C373del5	373 Deletion	Znf2 (354-373)
West, ES et al. Generalized ver	2014 II,7	No	Yes	Yes		c.1123C>T	L375F	375 Missense	Znf2 (354-373)
West, ES et al. Generalized ver	2014 II,1	No	Yes	No		c.1123C>T	L375F	375 Missense	Znf2 (354-373)
West, ES et al. Generalized ver	2014 II,2	No	Yes	No		c.1123C>T	L375F	375 Missense	Znf2 (354-373)
West, ES et al. Generalized ver	2014 II,6	No	Yes	No		c.1123C>T	L375F	375 Missense	Znf2 (354-373)
West, ES et al. Generalized ver	2014 II,17	No	Yes	No		c.1123C>T	L375F	375 Missense	Znf2 (354-373)
West, ES et al. Generalized ver	2014 II,18	No	Yes	No		c.1123C>T	L375F	375 Missense	Znf2 (354-373)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 14.11.2	No	Yes	No	Lung	c.1168_1170del1A	K390del	390 Frameshift	Post Znf2 (379-398)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 22	Not specified	No	Not specified lowB cell		c.1187G>A	R396Q	396 Missense	Post Znf2 (379-398)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 26	Not specified	Yes	Not specified		c.1187G>A	R396Q	396 Missense	Post Znf2 (379-398)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 27	Not specified	Yes	Not specified		c.1187G>A	R396Q	396 Missense	Post Znf2 (379-398)
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 46	Not specified	Yes	Not specified		c.1187G>A	R396Q	396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 3.11.6	No	Yes	Yes	Lung, cervical intra-	c.1192C>T	R398W	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 3.11.3	No	No	No		c.1192C>T	R398W	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 5.1.1	No	Yes	Yes	Auto-immunity	c.1192C>T	R398W	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 8.1.2	No	No	No		c.1193G>A	R398Q	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 8.1.3	No	No	Yes	-7	c.1193G>A	R398Q	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 8.1.1	No	No	Yes	Lung	c.1193G>A	R398Q	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 8.1.4	No	No	No		c.1193G>A	R398Q	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 8.1.5	No	No	No		c.1193G>A	R398Q	398 Missense	Post Znf2 (379-398)
Dickinson, R. E. et al. The evoli	2014 12.1.1	No	Yes	Yes	Auto-immunity, lun	c.1018-1G>A	del340-381	340-381	Splice
Gao, J. et al. Heritable GATA2	2014 Not specified	Not specified	Yes	Yes	46,XX,del(7)(q22q3	c.1074C>A c.1076T	T358K + L359V	358 + 359	Missense
West, RR et al. Acquired ASXL	2014 36	Not specified	Yes	Not specified ASXL1		c.1017+512C>T		Enhancer	Enhancer deletion
Wang, X et al. GATA2 and secc	2015 2-4	Yes	Yes	-7		c.802G>T	G268X	268 Non sense	PreZnf (1-259)
Wang, X et al. GATA2 and secc	2015 1-1	Not specified	Yes		MonoMAC; t(1;7)	c.892dupT	C298LfsX86	298 Frameshift	Znf1 (293-321)
Wang, X et al. GATA2 and secc	2015 1-2	Not specified	Yes		MonoMAC; t(1;7)	c.892dupT	C298LfsX86	298 Frameshift	Znf1 (293-321)
Griese, M. et al. GATA2 defic	2015 2	No	No	Yes	Pulmonary alveolar	Not specified	Y377D	377 Missense	Znf2 (354-373)
Cortes-Lavaud, X. et al. GATA2	2015 Not specified	Not specified	Yes	Yes		c.1187G>A	R396Q	396 Missense	Post Znf2 (379-398)
Wang, X et al. GATA2 and secc	2015 1-3	Not specified	Yes		MonoMAC; t(1;7)	c.892dupT + c.1168C	C298LfsX86 + K390de	298 + 390	Frameshift
Hahn, CN et al. Characteristic	2015 Proband	No	Yes	No		c.1073C>A c.1075T	T358N + L359V	358 + 359	Missense
Wang, X et al. GATA2 and secc	2015 3-5	Yes	No	-7		c.1018-2A>G		Splice	Splice Site
Wang, X et al. GATA2 and secc	2015 3-6	No	Yes	-7		c.1018-2A>G		Splice	Splice Site

Analyse fonctionnelle des mutations germinales de GATA2

Actuellement, peu d'éléments fonctionnels dans la littérature permettent de comprendre le lien entre les mutations de *GATA2* et la variabilité du phénotype hématologique et immunologique entre les différents patients et tout au long de leur vie. Même si des mécanismes communs conduisent probablement à une hémopathie maligne, la diversité des phénotypes observés chez des patients présentant des mutations sur le même domaine fonctionnel ou au sein d'une même famille, reflète probablement différentes activités transcriptionnelles et/ou l'existence de mutations somatiques additionnelles agissant en coopération. En sus de l'absence de corrélation génotype/phénotype, l'existence des rares 'porteurs sains' (malades asymptomatiques entre la 5^{ème} et 6^{ème} décennie) interroge aussi sur ces aspects additionnels. Dans notre cohorte de 78 patients, 5 patients ne présentent aucun symptôme à un âge adulte (Pasquet et al, en préparation, article 2).

De nombreux mécanismes physiopathologiques ont été évoqués, même si le mécanisme d'haploinsuffisance reste le plus consensuel. Notamment, le principal argument repose sur l'observation de mutations résultant en un allèle nul (décalage du cadre de lecture ou nonsense) ayant un phénotype similaire aux mutations caractérisées par la substitution d'un acide aminé. Malheureusement, peu de publications rapportent des éléments fonctionnels solides pouvant corroborer ces hypothèses, et en cela ce travail est original et important.

Les mutations ponctuelles au niveau des doigts de Zn résultent en une modification de leur liaison à l'ADN et par conséquent à une potentielle altération de leur fonction. Initialement en 2011, Hanh *et al.* ont mis en évidence et étudié 2 mutations situées sur le deuxième doigt de Zn (p.Thr354Met and p.Thr355del), et ont montré que ces mutations entraînaient une diminution de l'affinité des mutants avec leurs séquences d'ADN cibles, ainsi qu'une diminution de leurs capacités de transactivation de gènes cibles en collaboration avec PU.1 (CSF1R)². Les 2 mutants testés en condition de transfection transitoire montrent à la fois un effet perte de fonction, mais aussi un effet dominant négatif. De plus, le mutant T354M a un effet additionnel in vitro en bloquant la différenciation des cellules HL-60 sous l'influence de l'ATRA. Différents mutants faux-sens ont ensuite été étudiés et ont montré une diminution des capacités de transactivation dans un modèle cellulaire commun HEK293 :

- 2 mutations situées sur le 2ème doigt de ZN (R361L et C373R) et identifiées chez des patients présentant un syndrome d'Emberger²⁸⁷.

- Une insertion de 24pb entre A350 et N351, soit proche du mutant T354M (initialement décrit comme ayant un effet partiel dominant négatif), ainsi que la mutation R308P chez 2 patients présentant une LAM *de novo* ³³⁷.
- Récemment une double mutation T358N/L359V dans une famille présentant un syndrome LAM/MDS et thrombocytopénie, mimant un syndrome de prédisposition lie à RUNX1 ³³⁸. D'autre part, dans ce contexte, il est intéressant de noter que L359V se comporte comme un mutant perte de fonction.

Ces premières publications ont permis de soulever le problème de la complexité de l'étude des mutations de GATA2 et la nécessité de travaux additionnels analysant rigoureusement les différents mutants dans des modèles cellulaires appropriés.

Seule l'inactivation conditionnelle de la zone régulatrice en +9.5kb dans l'intron 5 a été étudiée dans un modèle murin, dans la mesure où elle est le siège de courtes délétions de 28pb chez des malades présentant un syndrome MonoMAC ^{184,185}. Comme nous l'avons vu, cette dernière contient une E box, un spacer ainsi qu'un motif GATA, permettant une régulation positive des gènes pan-endothéliaux et l'expression de GATA2 dans les cellules endothéliales lymphatiques, cardiaques et vasculaires ¹⁸⁸. Chez l'homme, que ce soit la délétion de 28pb ou la mutation ponctuelle de cet enhancer, les essais de gène rapporteur montrent une réduction de l'activité de cet enhancer ainsi que du transcrit ARNm de GATA2 (50 à 70%, analyse du ADNc possible par suivi des SNP homozygotes additionnels sur *GATA2*) associé à l'expression d'un profil transcriptionnel commun ²⁸⁸. Dans un modèle murin où *Gata2* a été délété spécifiquement des compartiments hématopoïétiques et endothéliaux ou présentant une délétion courte au sein de cet enhancer, les embryons meurent autour entre E13.5 ¹⁸⁵ E16.5 ¹⁸⁴ d'hémorragie extensive avec œdème, témoin d'un défaut dans le développement vasculaire lymphatique et s'accompagnant d'un défaut d'hématopoïèse primitive. A la différence du KO du gène, la mise en place de l'hématopoïèse primitive reste conservée au niveau du sac vitellin, mais la délétion en *cis* a un rôle sur la fonction des progéniteurs et des CSHs impliqués dans l'hématopoïèse au foie fœtal. Des travaux additionnels ont permis de montrer que la génération de CSHs adultes (reconstitution à long terme) à partir de l'endothélium hémogénique au sein de la région AGM de l'embryon était perturbée dans le même modèle ¹⁸⁹. Nous avons vu que cet élément de régulation en +9.5kb gouverne certains sets de gènes de l'endothélium hémogénique (*Lyl1*, *Spi1*, *Ikzf1*), d'autres

impliqués dans l'hématopoïèse comme *Scf/TAL1* et certains gènes dans les 2 types cellulaires (*Gata2*, *Myb*, *Mpl*, *Cdk6*, *Runx1*...). L'hétérozygotie de cette mutation en +9.5 conduit aussi à un défaut au niveau des cellules souches (réduction de nombre et de capacités d'autorenouveau à long terme), et à une diminution de l'expression de *Gata 2* mais n'est pas létale.

Notre travail est important car il apporte les bases fonctionnelles de l'étude de 2 mutations situées dans des domaines fonctionnels différents (R204X conduisant à un codon stop avant les doigts de Zn et R396Q, mutation faux sens sur le second doigt de ZN), chez des patients présentant un phénotype distinct (hémopathie maligne versus syndrome MonoMAC).

Ce travail fournit la démonstration d'un rôle clair « perte de fonction » du mutant R204X, dont la protéine reste présente et détectée au niveau du cytoplasme, mais incapable de remplir son rôle nucléaire par perte du signal de localisation nucléaire. En cela, les modèles murins développés ultérieurement nous permettront de mieux appréhender les conséquences de cette perte de fonction, qui peuvent être relativement proches de ce qui est observé en cas d'hétérozygotie (nombre diminué de CSHs fonctionnelles et dans leur capacité à générer des précurseurs de la lignée granulo-macrophagique)^{238,283}. L'origine développementale commune des cellules macrophagiques, dendritiques et lymphoïdes (précurseurs GMP et MLP) explique le phénotype MonoMAC observé chez les patients (déficit en cellules B, NK et cellules dendritiques). Onodera *et al.* ont récemment montré dans un modèle murin de KO du gène que GATA2 était préférentiellement impliqué dans la génération de cellules dendritiques à partir de la différenciation myéloïde, et non lymphoïde dans un modèle plus conventionnel mais discutable de séparation myéloïde/lymphoïde dans la génération de cellules dendritiques²³⁶. Cependant la mécanistique précise du rôle de GATA2 dans ce déficit immunitaire n'est pas connue à ce jour, l'extinction directe de l'expression de GATA2 par un shARN dans les CSHs ne permettant pas de reproduire le phénotype cellulaire *in vitro*³⁰¹. L'équipe de Matthew Collin a de plus mis en évidence dans une cohorte de patients DMLC/MonoMAC l'existence d'une majoration de FLT3 ligand dans le sang circulant chez ces patients, associée à une réduction des cellules précurseurs CD34 circulantes, élément décrit dans les aplasies médullaires mais non dans les myélodysplasies^{314,315}. FLT3 ligand est produit par les cellules T activées et les cellules stromales³³⁹. De façon intéressante, à l'étape de transformation leucémique après une longue latence, FLT3 ligand

s'effondre (expansion des cellules souches médullaires et consommation du ligand ?), pouvant ainsi être un marqueur important de suivi de la maladie.

La fonction du mutant R396Q semble plus complexe, dans le sens où nous avons pu reproduire *in vitro* le phénotype leucémique. Il ne s'agit pas seulement d'un effet « dose » que nous aurions pu suspecter compte tenu des observations résultant des travaux de surexpression de GATA2²⁸⁵ pour 2 raisons :

- En premier lieu, ce modèle de surexpression résulte en un blocage de différenciation des progénitures myéloïdes au stade GMP, accompagné d'une majoration de leur capacité de prolifération, mais sans génération de phénotype leucémique *in vitro* et chez les souris transplantées et/ou transgéniques ;
- La deuxième résulte dans l'observation d'un blocage partiel de la différenciation myéloïde lors de la transduction des progéniteurs myéloïdes murins avec le vecteur WT dans nos travaux, sans la aussi conduire à un phénotype leucémique (signature FACS et absence de prolifération cellulaire)

Récemment Cortes-Lauvaud *et al.* ont publié certains éléments fonctionnels sur la mutation germinale R396Q, notamment en montrant une diminution de la boucle d'autocontrôle du gène *GATA2* sur ses propres régions régulatrices en -2.4kb (homologue au site en -1.8kb chez la souris) et une réduction de l'expression de GATA 2 de près de 50%³⁴⁰, élément déjà observé dans une cohorte de patients MonoMAC avec une mutation située sur la région régulatrice de l'intron 5²⁸⁸. Ces résultats sont concordants avec un mécanisme d'haploinsuffisance mais ne permettent pas d'expliquer le phénotype leucémique des patients.

L'analyse incomplète des données de cytologie et de cyométrie en flux dans leurs essais de différenciation myéloïde conduit les auteurs à ignorer le phénotype transformant de ce mutant. Les données des analyses transcriptomiques de cette publication et de notre travail semblent néanmoins concordantes pour laisser penser que cette mutation modifierait la liaison de GATA2 avec ses gènes cibles et ainsi pourrait induire le phénotype leucémique observé. Dans notre étude, RUNX1T1 (ETO) est un excellent candidat, les analyses en ChIP seq sur la lignée cellulaire K562 démontrant une interaction entre GATA2 et ETO (exon 1)¹⁴¹. Nous avons pu montrer qu'ETO était surexprimé dans les lignées cellulaires murines obtenues après différenciation *in vitro*, mais nous n'avons pas pu reproduire cela chez

l'homme, probablement en raison du faible nombre de cas testés, de la pauvreté du matériel analysable du point de vue de l'expression et du timing des analyses réalisées sur du matériel après transformation leucémique. RUNX1T1 est un corépresseur de l'hématopoïèse dont le rôle dans la leucémogénèse est maintenant bien décrit dans les LAM avec translocation (8;21)³⁴¹, et semble jouer un rôle dans la régulation et la spécification des cellules souches embryonnaires dans un modèle murin³⁴².

De nombreux auteurs ont rapporté chez quelques pedigrees humains la présence de mutations somatiques du gène *ASXL1* chez des patients (jusqu'à 30% des patients dans la cohorte du NIH) présentant des mutations germinales de *GATA2* et ayant une incidence de transformation leucémique importante^{305,307}. Des travaux similaires ont été réalisés dans notre laboratoire sur un échantillon de patients (10) présentant des mutations *GATA2*, de nombreuses mutations somatiques ont été retrouvées impliquant la voie RAS (*KRAS*, *BRAF*, *MAP2K2*, *NRAS*), associées aux LAM (*WT1*, *STAG2*, *HOXC13*, *NOTCH2*), aux MDS (*U2AF1*, *SETPB1*, *TET2*) récemment rapportées par Wang *et al.*³⁰⁹, ainsi que d'autres mutations touchant les éphrines par exemple. Nous n'avons pas retrouvé de mutation d'*ASXL1* dans notre cohorte. Un patient a bénéficié d'un suivi longitudinal depuis son diagnostic grâce à l'extraction d'ADN sur lame, ce qui a permis de retracer l'acquisition de mutations somatiques, l'acquisition finale de mutations de *NRAS* Q61K et *SMC1A* N108Y jouant un rôle initiateur dans la leucémogénèse finale.

Enfin un modèle de leucémogénèse lié à *GATA2* récemment publié est particulièrement intéressant et concerne un réarrangement connu du gène *EVI1* (inv(3)(q21q26)) : l'inversion entre les régions 3q21 et 3q26 permet à l'enhancer de *GATA2* situé en -77kb de jouer le rôle de « super-enhancer » pour *EVI1*, résultant en une surexpression d'*EVI1* et créant le socle de la transformation leucémique dans un modèle murin de souris transgénique³⁴³ (Figure 18).

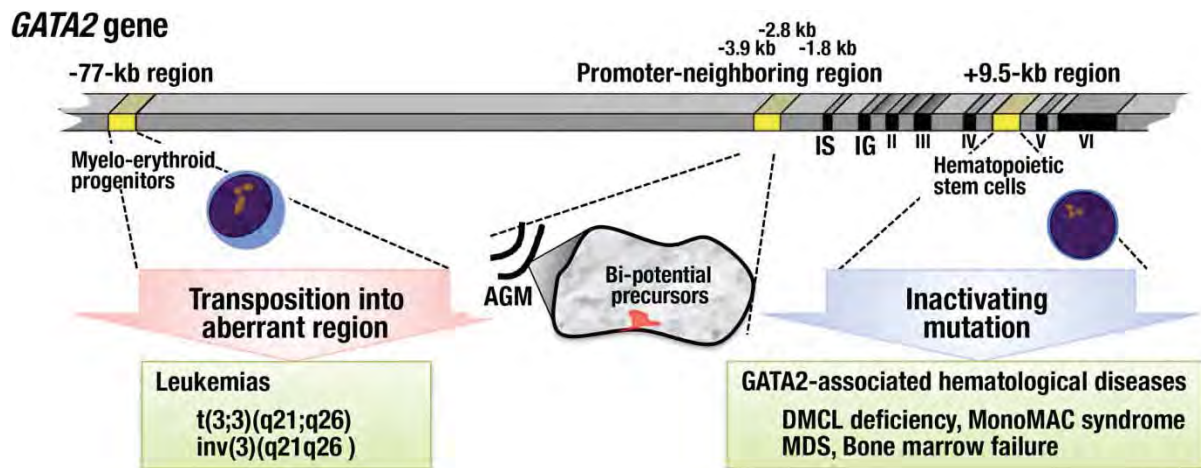


Figure 18. Représentation schématique de l'implication des mutations de GATA2 dans la pathologie immuno-hématologique¹¹¹.

En conclusion, les mutations GATA2 semblent agir selon un mécanisme principal d'haploinsuffisance, et notre travail corrobore ces conclusions, même si certaines mutations comme R396Q peuvent avoir une fonction résiduelle et réguler des gènes cibles impliqués dans la leucémogénèse. La progression de la maladie hématologique est difficile à apprécier et peut être comprise sous la forme d'une attrition progressive des CSHs depuis la naissance, qui ne peuvent pas ensuite maintenir une hématopoïèse normale. La survenue d'évènements clonaux et l'élévation de FLT3 Ligand en sont le reflet. Nous verrons dans une dernière partie les modèles animaux développés et à venir dans le laboratoire qui vont nous permettre de mieux comprendre la pathologie.

Travaux non publiés

Modèle drosophile

Une collaboration a été initiée entre notre équipe de recherche et l'équipe de recherche du Dr Lucas Waltzer (Venecia Ferrer, étudiante en Master 1, Centre de Biologie du Développement (CDB), Université Paul Sabatier).

En biologie, l'utilisation de modèles alternatifs au modèle murin permet parfois de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en cause. La drosophile (*Drosophila melanogaster*) semble un bon modèle pour étudier les gènes de l'hématopoïèse dans les maladies humaines ³⁴⁴. On y distingue 2 phases d'hématopoïèse chez cet organisme: une chez l'embryon et une autre chez la larve, conduisant à la formation de progéniteurs sanguins. La drosophile présente 3 types de cellules sanguines matures apparentées aux cellules myéloïdes des mammifères et collectivement appelées hémocytes (Fossett, 2013). Ces cellules sont les plasmotocytes (rôle dans la phagocytose, comme les macrophages) représentant 95% des hémocytes totaux, les cellules à cristaux (rôle dans la mélanisation et dans des processus de défense), et les lamellocytes, qui ne sont pas présents en condition normale mais sont produits en condition de challenge immun (rôle dans l'encapsulation de corps étrangers ne pouvant être phagocytés).

De même que chez l'homme, des facteurs GATA chez la drosophile sont impliqués dans l'hématopoïèse ³⁴⁵. C'est le cas de Serpent (Srp), nécessaire pour ce processus et en particulier pour la formation des prohémocytes, ainsi que pour la différenciation des plasmotocytes et des cellules à cristaux. Alors que chez les vertébrés, tous les facteurs GATA possèdent 2 doigts de zinc, certains GATA des invertébrés n'ont qu'un seul doigt de zinc (de type C-terminal). Il a été montré que par épissage alternatif, il y a production de 2 isoformes de Srp dont l'une possède une organisation plus proche de celle des GATA vertébrés, *i.e.* avec 2 doigts de zinc ³⁴⁵. Ces 2 isoformes contrôlent le développement des cellules sanguines et présentent à la fois des activités communes et des activités spécifiques, vis à vis de l'activation de certains gènes exprimés dans les hémocytes. De plus, des données non publiées de l'équipe de Lucas Waltzer indiquent qu'un autre facteur GATA, Pannier (Pnr), est impliqué dans l'hématopoïèse chez la larve de drosophile. Srp et Pnr présentent un degré de conservation importante avec GATA2 humain au niveau des 2 doigts de Zn (Figure 19). En

particulier, le résidu R396 muté chez l'homme est conservé dans ces deux protéines de Drosophile. En exprimant chez la drosophile les protéines Srp et Pnr sous forme sauvage ou portant une mutation homologue à R396Q, nous avons cherché à mettre en évidence des différences phénotypiques et de localisation entre la forme mutée par rapport à la forme normale, afin de mieux comprendre comment la mutation R396Q peut affecter l'activité de GATA2 et participer au développement de leucémies chez l'Homme.

```

GATA-2 291 EGRECVNCGATATPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLS---AARRAGT 345
PNR      165 EGRECVNCGAISTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGMNRPLIKPSKRLVSATATRRMGL 224
SRP      416 EGRECVNCGAISTPLWRRDNTGHYLCNACGLYMKMNGMNRPLIKQPRRLS---ASKRAGL 470
          ***** :***** ***** ***** ***** :** *:* *
GATA-2 346 C[AN]CQTTTTLWRRNANGDPV[NA]CGLYYKLHNVNRPLTMKKEGIQT[NA]NRKMSNKS[SKS]407
PNR      225 C[AT]NCGT[TT]TLWRRNNDGEPV[NA]CGLYYKLHGVNRPLAMRKDGIQT[NA]KRKPKKTGSGS284
SRP      471 S[SN]CHTHTSLWRRNPAGEPV[NA]CGLYYKLH[V]PRPLTMKKDTIQ[NA]KRKPKGT[SEK]532
          *:* * * :***** * :***** * * *:***: **.*:*** . . .

```

Figure 19. Alignement des 3 séquences protéiques (GATA2, Pnr et Srp) centré sur les domaines à doigts de zinc. Il n'y a pas d'homologie en dehors de ces domaines. Le résidu R396 est surligné en jaune. Les 4 paires de cystéines servant de coordination pour les 2 doigts de zinc sont surlignées en gris (clair : doigt N-terminal ; foncé : doigt C-terminal).

Durant ma thèse, j'ai réalisé les premières étapes de ce projet, à savoir le clonage de Srp^{WT} étiqueté par l'épitope HA dans le vecteur Topo Blunt II, puis les étapes de mutagenèse dirigée permettant la génération de Srp^{R396Q}; enfin, avec l'aide de l'équipe de Lucas Waltzer le clonage final de Srp^{WT} et Srp^{R396Q} dans pUAS ainsi que l'insertion du transgène chez l'animal ont été réalisés. L'ensemble des manipulations sur la drosophile ont été menées par Venecia Ferrer.

Le pilote utilisé afin de vérifier que les différents transgènes pour Srp et Pnr marqués par l'épitope HA sont bien exprimés est *lozenge-Gal4* (*lz-Gal4 UAS-GFP*). Ce pilote permet une expression dans le lignage des cellules à cristaux ainsi que dans certains disques imaginaux, en particulier le disque de l'œil. Ce pilote est sur le chromosome X et inséré dans le gène *lz*, donc seules les larves femelles (hétérozygotes pour *lz-Gal4*) du stade larvaire 3 (L3) sont récoltées, puis disséquées afin d'effectuer une analyse avec l'anticorps anti-HA (révélé en rouge).

De façon intéressante, alors qu'avec les formes sauvages de Pnr et Srp on observe 2 ou 3 points de forte accumulation dans le noyau, le profil d'expression est différent avec les formes mutantes. Ainsi Pnr^{R396Q} montre de nombreux petits points intenses dispersés dans le noyau et Srp^{R396Q} présente un marquage nucléaire plus uniforme (Figure 20). De plus, contrairement aux formes sauvages, Pnr^{R396Q} et Srp^{R396Q} s'accumulent aussi dans le cytoplasme. La mutation R396Q semble donc affecter la localisation sub-cellulaire de ces facteurs GATA.

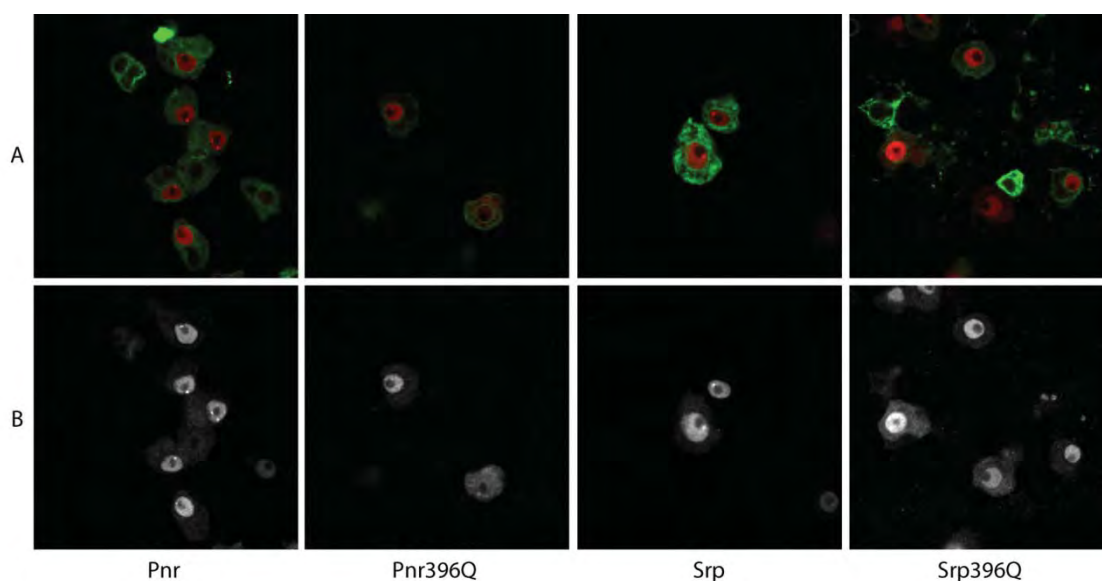


Figure 20. Vues confocales de l'expression des protéines Pnr, Pnr^{R396Q}, Srp, Srp^{R396Q} (taggées HA) dans les cellules à cristaux des glandes lymphatiques issues des 4 génotypes d'intérêt (Iz-Gal4,UAS-GFP/+ ; UAS-3HA-Pnr/+ pour Pannier sauvage, Iz-Gal4,UAS-GFP/+ ; UAS-3HA-PnrR396Q/+ pour Pannier muté, Iz-Gal4,UAS-GFP/+ ; UAS-3HA-Srp/+ pour Serpent sauvage et Iz-Gal4,UAS-GFP/+ ; UAS-3HA-SrpR396Q/+ pour Serpent muté). (A) les cellules à cristaux sont marquées par la GFP (en vert) et par l'anticorps anti-HA (en rouge). (B) visualisation noir et blanc du marquage anti-HA (canal rouge)

Au niveau de la transcription, la présence de cette mutation n'empêche pas Srp ou Pnr d'activer l'expression de *ush* (*u-shaped*, code pour un membre de la famille ZFPM1/FOG1). Sa présence entraîne cependant une diminution de l'activité transactivatrice de Srp sur *Gcm* (*glial cells missing*, requis pour la détermination du programme des plasmocytes) et *Crq* (*croquemort*, marqueur spécifique des plasmocytes) et de Pnr sur *Gcm* (moins discriminant car à la fois Pnr sauvage et muté ne semblent pas capables d'activer l'expression de *Crq*).

Enfin, l'expression ectopique de Pnr muté ne semble pas induire de phénotype dans les hémocytes de la drosophile, alors que pour Srp^{R396Q}, on observe des effets plus faibles que ce que l'on obtient avec Srp^{WT} (défaut de maintien des progéniteurs dans la glande, différenciation de lamellocytes...).

La conclusion à ces expériences préliminaires serait que la mutation R396Q diminue l'activité des facteurs GATA chez la drosophile, modèle concordant avec notre modèle *in vitro*. L'accumulation et le niveau d'expression des facteurs GATA semblent équivalents (et nucléaire) mais la localisation sub-nucléaire semble aussi affectée pour les 2 versions mutantes et on note aussi une expression cytoplasmique ectopique. Cependant ces expériences devront être répétées et complétées, notamment en changeant le pilote *Gal4* pour confirmer ces premiers résultats.

Modèle murin de reconstitution hématologique

Suite aux résultats encourageants obtenus *in vitro*, j'ai développé un modèle murin de reconstitution hématopoïétique en parallèle du développement d'un modèle de knock-in (KI) plus complexe abordé ultérieurement.

Le modèle expérimental choisi a été le suivant : nous avons trié chez des souris C57BL/6 des progéniteurs et cellules souches après injection préalable de 5-fluoro-uracile, et nous les avons infectées avec le vecteur MIE-GATA2^{WT}, MIE-GATA2^{R396Q} ou le vecteur vide (MIE). Nous n'avons pas travaillé sur la mutation R204X initialement en l'absence de phénotype observé *in vitro*. Un million de cellules infectées (taux d'infection autour de 30% quantifié grâce à l'expression de la GFP) ont été réinjectées ensuite à 3 groupes de 6 souris ayant le même fond génétique et irradiées létalement.

Les souris ont été saignées à J25 afin d'apprécier la reconstitution hématopoïétique puis tous les 15 jours à 3 semaines jusqu'à 6 mois date à laquelle elles ont été sacrifiées en raison de l'observation d'une mortalité infectieuse probablement parasitaire dans les 3 groupes rendant la poursuite et l'interprétation des résultats délicate.

Une numération a été réalisée à partir d'échantillons sanguins recueillis sur EDTA et analysés sur un automate Micros 60 (Horiba ABX, France). Des étalements sur lame ont été réalisés colorés au May-Grünwald-Giemsa et comptés manuellement afin d'apprécier la densité de plaquettes mal estimée par l'automate et de détecter des anomalies qualitatives hématologiques. A partir de ces échantillons, les globules rouges ont été lysés permettant

une analyse en cytométrie en flux pour les marqueurs Ly6C, Ly6G, CD115, CD11b ainsi que des marqueurs lymphoïdes CD49b (NK), CD3 (lymphocyte T) et CD19 (lymphocyte B). Tous les résultats ont été analysés en utilisant un test des variances ANOVA suivi d'un test de Bonferroni (Graph Pad 5). Les différences étaient significatives si $p < 0.05$ (*), 0.02 (**), 0.001(***) et 0.002(**).

L'impact de MIE-GATA2^{R396Q} sur la reconstitution hématopoïétique comparé à MIE ou MIE-GATA2^{WT} a été apprécié à J25 (Figure 21). Le nombre absolu de leucocytes était de $4,1 \pm 1,8$, $5,8 \pm 1,8$ et $2,2 \pm 0,7$ G/L(**) pour les groupes MIE-GATA2^{WT}, MIE et MIE-GATA2^{R396Q} respectivement. Le nombre absolu de neutrophiles était de $1,7 \pm 0,7$, $1,8 \pm 0,6$ et $0,9 \pm 0,3$ G/L(*) pour MIE-GATA2^{WT}, MIE et MIE-GATA2^{R396Q} respectivement et de lymphocytes de $2,1 \pm 1,2$, $3,5 \pm 1,4$ et $1,2 \pm 0,4$ G/L(**) pour les MIE-GATA2^{WT}, MIE et MIE-GATA2^{R396Q} respectivement.

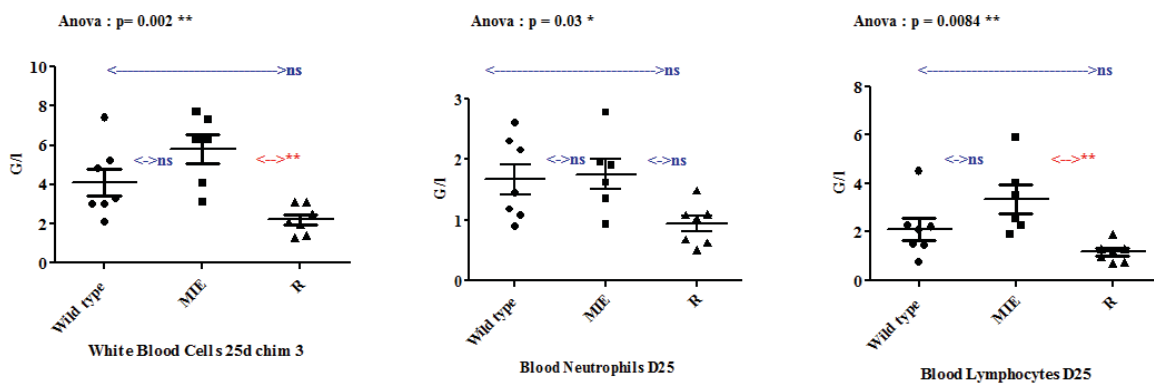


Figure 21. Impact de la présence du mutant R396Q sur la reconstitution hématopoïétique post allogreffe dans un modèle murin chimérique.

Ces résultats montrent que MIE-GATA2^{R396Q}, mais pas MIE-GATA2^{WT}, induit un délai dans la reconstitution hématopoïétique post-greffe, à la fois au niveau des granuleux et des cellules lymphoïdes.

Lors des saignées ultérieures, ni les analyses sanguines cytologiques, ni l'analyse en cytométrie en flux n'ont montré de phénotype leucémique chez MIE-GATA2^{R396Q}, MIE-GATA2^{WT} et MIE. Quand les souris ont été sacrifiées à M6, les analyses médullaires n'ont pas montré de cellules anormales, ni de phénotype myélodysplasique. En revanche, l'analyse en cytométrie en flux a montré une expression de la GFP dans la moelle et le sang circulant chez

les souris reconstituées par des cellules infectées avec MIE-GATA2^{R396Q} (et pas MIE-GATA2^{WT}), expression plus faible mais non visualisée jusque-là.

L'hypothèse soulevée au vu du rôle de GATA2 comme facteur de transcription hématopoïétique, et par analogie aux mêmes modèles développés pour GATA1 et GATA3, consiste en une rétention intra-médullaire des progéniteurs possédant le transgène, expliquant la reconstitution hématopoïétique retardée à partir des cellules sauvages, puis la mise en place retardée de programmes transcriptionnels permettant une différenciation terminale et expliquant la détection tardive de la GFP dans le sang des souris. De plus GATA2^{WT} semble être toxique à long terme ce qui n'est pas le cas pour GATA2^{R396Q} montrant tout de même que l'expression ectopique de ces deux formes n'est pas équivalente. Ce modèle ne permettant pas l'analyse d'un phénotype leucémique en moins de 6 mois, nous avons donc stoppé les manipulations afin de se consacrer au modèle de Knock-In plus physiologique.

Modèle murin knock-in (KI)

Devant les résultats encourageants de différenciation myéloïde *in vitro*, et les difficultés rencontrées lors de la mise en place d'un modèle de reconstitution hématologique, nous avons envisagé la génération d'un modèle murin KI pour la mutation GATA2^{R396Q}. La délétion de Gata2 étant létale à E10.5 *in vivo*, nous avons imaginé un modèle de remplacement conditionnel du dernier exon par un dernier exon muté R396Q (Figure 22). Ces souris ont été produites en collaboration avec le CIPHE à Marseille. Dans un premier temps, une recombinaison homologe a permis de remplacer le dernier exon sauvage par une construction permettant le flanquage de cet exon par une combinaison de site LoxP sauvages et mutés dans des orientations adéquates et ajout d'un exon terminal muté affublé des mêmes combinaisons de sites LoxP. Les deux exons terminaux ont également été taggués pour permettre de futures expériences de précipitation de la chromatine ou protéique. Une cassette Pgk-néomycine a aussi été introduite afin de réaliser une sélection dans les cellules ES, flanquée de sites *frt* permettant son élimination ultérieure.

Les animaux étant arrivés en août 2016 à Toulouse, les élevages sont en cours afin de croiser les animaux avec des souris Tie2-Cre (expression tissulaire hématopoïétique et vasculaire).

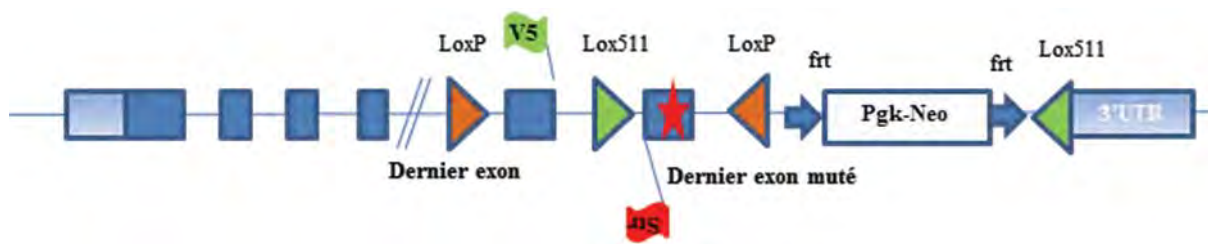


Figure 22. Modèle murin KI de la mutation R396Q.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis de répondre à des objectifs de recherche translationnelle et fondamentale concernant le gène *GATA2* et son implication dans la pathologie humaine.

Sur le plan clinique, la mise en évidence de cette mutation à partir de l'observation d'une famille toulousaine au sein du laboratoire a conduit à l'identification de nombreux patients et familles présentant les mêmes atteintes, à la description du phénotype clinique et à une réflexion thérapeutique plus large. Le phénotype décrit initialement en 2011 s'est enrichi progressivement avec la description de nouvelles atteintes dermatologiques, inflammatoires, vasculaires et oncologiques. L'identification de nouvelles familles permettra de préciser ce phénotype dans les années futures : une sensibilisation des dermatologues, oncologues, pneumologues, internistes et médecins vasculaires aux symptômes cliniques reste un enjeu important. En cela, l'existence d'un groupe national (« Club *GATA2* »), basé sur un registre, et constitué de cliniciens, biologistes, généticiens et chercheurs permet d'avoir une réflexion concertée et de discuter de la prise en charge de ces patients de façon bi-annuelle. D'autres questions éthiques concernant la possibilité de diagnostic prénatal, ou pré-implantatoire, et la place de la greffe pré-emptive devront être abordées dans le futur et soumises à des discussions individuelles.

Un petit nombre de patients, actuellement entre 6 et 10 dans la cohorte, nommés « **GATA2-like** », restent sans diagnostic génétique à ce jour malgré un phénotype clinique et biologique évocateur de mutation *GATA2*. Pouvoir proposer un diagnostic génétique à ces patients et mieux caractériser leur phénotype clinique et biologique reste un challenge pour la prise en charge adéquate de ces patients.

Les questions posées concernant les patients « *GATA2-like* » sont les suivantes :

- Ces patients présentent-ils un phénotype clinique, biologique, infectieux et biochimique identique à celui des patients mutés *GATA2* de la cohorte ?
- Ces patients ont-ils des mutations du gène *GATA2* non identifiées par les méthodes de routine ?
- Ces mutations potentielles sont-elles fonctionnellement pertinentes?
- Ces patients ont-ils d'autres mutations de gènes impliqués dans l'hématopoïèse?

Les patients qui présentent un phénotype « GATA2-like » seront explorés par deux laboratoires de référence pour GATA2 (dont le notre) avant de rentrer dans l'étude pour s'assurer que les analyses « standards » ont été réalisées. Ensuite seront réalisées les analyses suivantes à Toulouse et Newcastle, en collaboration avec le Pr M. Collin (Human Dendritic Cell Laboratory, Institute of Cellular Medicine, Newcastle University):

- Contenu génique (CGH): recherche de délétions ou amplifications géniques spécifiques ;
- Séquençage d'exome : recherche de mutations des parties codantes du génome de l'individu, ainsi que des régions flanquantes des exons
- Séquençage de l'ARN total : recherche de biais de transcription du gène *GATA2* (expression mono-allélique via l'identification de polymorphismes) et d'autres gènes potentiellement impliqués, leur éventuelle expression différentielle ou épissage alternatif ainsi que la présence de gènes de fusion.

Les analyses de séquençage d'exome et d'ARN seront réalisées en trio patient versus parents.

Des cas similaires ont été décrits en Grande Bretagne et le Pr. Collin propose pour ces patients une étude complémentaire à nos analyses. Il étudiera la fonction des cellules dendritiques chez ces patients, ainsi que l'expression protéique et la balance allélique. Chez les patients ayant une réduction de l'expression protéique et un déséquilibre de l'expression allélique, il propose un séquençage complet du locus *GATA2* par NGS (target capture for Next génération sequencing), à la recherche de mutation/délétion des régions régulatrices en *Cis*.

Un autre axe de recherche translationnelle concerne le dosage de FLT3 Ligand. L'équipe de Newcastle a publié récemment l'intérêt du dosage du ligand de FLT3 dans le sérum des patients *GATA2*^{1,301}. Des résultats préliminaires réalisés dans le laboratoire de Jacinta Bustamante (Institut Imagine, Necker, Paris) confirment qu'une élévation du ligand de FLT3 dans le sérum est corrélée avec un stade symptomatique de la maladie (données non publiées), alors que ce taux serait bas chez les apparentés non symptomatiques. Une collecte d'échantillons de ces patients est en projet en biochimie à l'hôpital Saint Louis (Dr Bruno Cassinat, Dr MH Schlageter). L'objectif de ce travail sera de comparer les taux sérique de FLT3L chez les patients présentant une mutation de *GATA2*, leurs apparentés et les

patients « GATA2-like » et apparentés. La confirmation de l'élévation des taux sériques de FLT3L permettrait aussi d'avoir un test diagnostique rapide, avant l'identification de potentielles mutations.

Grâce au registre des patients, nous avons aussi pu réaliser au laboratoire une analyse par séquençage d'exome chez 10 patients (7 familles) présentant une transformation leucémique (AREB ou LAM) et comparer les signatures obtenues à celles de la rémission hématologique. Les données sont en cours d'analyse et montrent d'ores et déjà l'existence de mutations secondaires intéressant des gènes de la voie RAS, de gènes impliqués dans les LAM/MDS et régulateurs de l'épigénétique (WT1, STAG2, HOXC13, TET2, SETBP1, ASXL1...).

Sur le plan fondamental, les perspectives suite à mon travail de thèse restent nombreuses.

Les conséquences fonctionnelles distinctes de 2 mutations situées dans des domaines fonctionnels différents ont pu être clairement établies dans un domaine de recherche récent où peu d'éléments sont actuellement connus. Malgré les difficultés rencontrées lors de la mise en place de modèles animaux, la génération du modèle murin KI va permettre de pouvoir analyser précisément les conséquences phénotypiques de la mutation R396Q *in vivo*, notamment sur la leucémogénèse et de se détacher des problèmes de dosage génique, importants dans un modèle impliquant les facteurs de transcription. En ce sens, ce modèle est adaptable à l'étude de nombreux facteurs de transcription et pourra être utilisé en ce sens dans le futur. Actuellement, les souris vont être croisées avec des souris Tie2-Cre, permettant l'expression spécifique de la mutation R396Q dans les tissus hématopoïétiques et vasculaires à des temps différents. Ces souris seront suivies avec les techniques développées lors de l'étude des modèles transgéniques, saignée et analyse des numérations et lames, ainsi que phénotypage par cytométrie en flux des compartiments myéloïdes et lymphoïdes. Cela nous permettra de détecter les événements précoces de la leucémogénèse. Nous disposons aussi des cellules ES modifiées qui permettront de réaliser des analyses en parallèle du modèle murin. Les modèles de différenciation hématopoïétiques développés durant ma thèse seront appliqués et l'existence d'un tag permettra de réaliser des expériences de séquençage après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP sequencing) pour déterminer les cibles du mutant R396Q et valider nos premiers résultats. La spectrométrie de masse sera appliquée pour déterminer les protéines partenaires du WT GATA2 et du mutant R396Q.

Nous avons pu commencer à identifier des événements secondaires chez les patients et grâce à l'analyse transcriptomique. En cela le modèle de leucémogénèse se rapproche de celui décrit pour RUNX1 et CEBPA avec une différence importante liée à l'absence de deuxième événement sur GATA2 dans notre modèle par rapport aux modèles décrits dans la littérature pour RUNX1 et CEBPA. Les lignées cellulaires murines obtenues *in vitro* dans ma thèse vont aussi être soumises à un séquençage d'exome pour identifier d'éventuels événements secondaires communs avec les patients étudiés préalablement. Si les souris KI développent un phénotype leucémique, les cellules murines de moelle osseuse seront aussi analysées avec les mêmes techniques. Il sera alors possible d'utiliser des cribles de cibles potentiellement intéressantes sur le plan thérapeutique par des approches de létalité synthétique comme celle basées sur le système CRISPR/cas9.

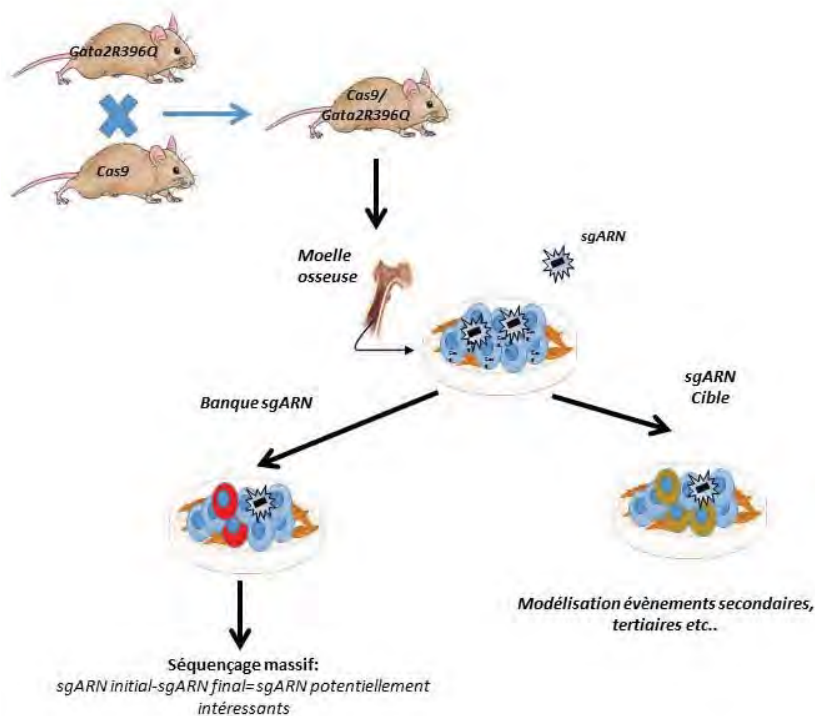


Fig 23. D'après ³⁴⁶. Les cellules de la moelle osseuse des souris exprimant Gata2R396Q (après l'action de la recombinaise CRE) pourront servir de base soit pour modéliser les événements secondaires et vérifier qu'ils sont indispensables à la transformation leucémique soit pour un crible de type létalité synthétique pour trouver de potentielles cibles thérapeutiques qui relaièrent l'action de la mutation R396Q

Ce modèle murin représente aussi un moyen unique d'exploration du déficit immunitaire associé au phénotype GATA2. Nous pourrions ainsi envisager des collaborations avec une équipe d'immunologie (Pr Collin, NewCastle) concernant l'étude des fonctions immunologiques de cette souris KI.

Enfin, des perspectives thérapeutiques seront testées, dans la mesure où actuellement le seul traitement reste l'allogreffe de moelle pour ces patients et qu'il reste complexe de moduler directement un facteur de transcription. Le blocage des cibles déjà identifiées

comme RUNX1T1 et à venir par les différentes techniques décrites ci dessus permettra de déterminer les différentes cibles thérapeutiques possibles. Ces résultats pourront être transposés aux cellules des patients dans un deuxième temps.

Annexes

Annexe 1, RHOP, volume 4 - N° 1, P. 13-24 - mars 2016

Mutations GATA2 : une entité clinico-biologique pléomorphe. Recommandations de prise en charge du « club GATA2 »

M. Pasquet, C. Fieschi, C. Bellanné-Chantelot, F. Sicre de Fontbrune, M. Lamant, E. Delabesse, J. Donadieu

Annexe 2, Hématologie, volume 20, numéro 3, Mai-Juin 2014

GATA2, un nouvel oncogène des LAM familiales.

Pasquet M, Delabesse E,

Annexe 3, Correspondances en Onco-hématologie, 2013

GATA2 : un nouveau gène des myélodysplasies (MDS) et leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) familiales. `

Pasquet M, Delabesse E.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



MISE AU POINT

Mutations GATA2 : une entité clinico-biologique pléomorphe. Recommandations de prise en charge du « club GATA2 »



GATA mutations: Pleomorphic clinical and biological entity. Guidelines for management of "GATA2 club"

M. Pasquet^{a,*,b}, C. Fieschi^c, C. Bellanné-Chantelot^d,
F. Sicre de Fontbrune^e, M. Lamant^a, E. Delabesse^b,
J. Donadieu^{f,g}, le club GATA2¹

^a Service d'hématologie immunologie et oncologie pédiatrique, hôpital des Enfants, CHU Purpan, 339, avenue de Grande-Bretagne, 31059 Toulouse cedex 9, France

^b Inserm U1037, centre de recherche sur le cancer de Toulouse, 31000 Toulouse, France

^c Service d'immunopathologie clinique, hôpital Saint-Louis, université Paris 7 Denis-Diderot, PRES Sorbonne Paris-Cité, 75011 Paris, France

^d Département de génétique, AP-HP, 75013 Paris, France

^e Service d'hématologie et greffe de moelle, hôpital Saint-Louis, 75011 Paris, France

^f Service d'hématologie et oncologie pédiatrique, AP-HP Trousseau, 75012 Paris, France

^g Registre national des neutropénies, 75012 Paris, France

Reçu le 17 octobre 2015 ; accepté le 14 décembre 2015

Disponible sur Internet le 18 janvier 2016

MOTS CLÉS

GATA2 ;
Myélodysplasie ;
Leucémie aiguë
myéloblastique ;
Déficit immunitaire ;
Allogreffe de moelle

Résumé Depuis 2011, des mutations germinales hétérozygotes du gène qui code pour le facteur de transcription GATA2 (*GATA2*) ont été identifiées chez des patients présentant des syndromes myélodysplasiques (SMD), des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) familiales, un déficit immunitaire (syndrome MonoMAC) et un syndrome d'Emberger (myélodysplasie avec lymphœdème). Au-delà de ces formes, il s'agit d'un véritable syndrome complexe associant de façon hétérogène, des atteintes hématologiques, pulmonaires, dermatologiques, cardiovasculaires, oncologiques, et ORL. Les mutations de *GATA2* semblent dans la majorité des cas entraîner une haploinsuffisance, même si un effet dominant-négatif ne peut être écarté. Compte tenu de la

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pasquet.m@chu-toulouse.fr (M. Pasquet).

¹ Voir note d'auteur « Composition du Club GATA2 ».

gravité des hémopathies myéloïdes et du déficit immunitaire, la prise en charge thérapeutique de ces patients reste difficile, reposant actuellement sur des prophylaxies anti-infectieuses et sur l'allogreffe de moelle. Nous présentons ici les recommandations de prise en charge et de suivi de ces patients, élaborées au sein du « club GATA2 », groupe de cliniciens, biologistes et chercheurs activement impliqués dans la prise en charge clinique et la recherche dans ces atteintes. La reconnaissance de ce syndrome de prédisposition associé aux mutations de GATA2 pose de nombreuses questions en termes de conseil génétique et de diagnostic anténatal pour les patients et leurs familles, dans une maladie où persistent nombreuses inconnues.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

GATA2;
Myelodysplasia;
Acute myeloid
leukemia;
Immunodeficiency;
Bone marrow
transplantation

Summary Since 2011, germline mutations of the GATA2 transcription factor gene have been identified in familial myelodysplasias (MDS), acute myeloid leukemia (AML), immunodeficiency (MonoMAC syndrome) and Emberger syndrome (MDS with lymphedema). Beyond these diseases, it represents a complex disease with pulmonary, dermatologic, cardiovascular, oncologic and stomatologic disorders. Mutations appear to lead to haploinsufficiency, even though a dominant negative effect cannot be ruled out. Due to the lethal nature of GATA2 deficiency with AML/MDS or immune deficiency, treatment with antibiotics and allogenic bone marrow transplantation remains a challenge. We present here the clinical recommendations for initial screening and follow up, developed within the "GATA2 club", a group of doctors, biologists and researchers involved in this area. Recognition of this entity allows us to better manage patients and families with careful genetic counselling and prenatal diagnosis.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

En 2011, des mutations hétérozygotes germinales du facteur de transcription GATA2 ont été identifiées chez des patients présentant des maladies hématologiques, immunologiques et vasculaires : myélodysplasies et leucémies aiguës myéloblastiques familiales [1], syndrome MonoMAC (déficit en cellules dendritiques, monocytes, B et NK et prédisposition aux infections mycobactériennes) [2,3] et syndrome d'Emberger (myélodysplasie avec lymphoedème) [4]. Les premiers patients français ont été identifiés au sein du Registre national des neutropénies congénitales [5]. La mise en évidence de mutations de GATA2 au sein de ces familles a permis de mieux comprendre le spectre clinique et biologique de ce syndrome, qui dépasse largement le cadre immuno-hématologique. Actuellement, 36 familles incluant 62 patients ont été diagnostiquées en France dont la prise en charge implique différents spécialistes d'organes (immuno-hématologues, pneumologues, infectiologues, dermatologues, oncologues, médecins vasculaires, internistes). Cette revue a pour objectif de mieux comprendre les conséquences cliniques et biologiques des mutations hétérozygotes de GATA2. Elle rassemble aussi les recommandations du « club GATA2 », groupe de cliniciens, biologistes et chercheurs impliqués dans la prise en charge des patients et dans la recherche clinique, translationnelle et fondamentale dans un domaine où le degré de preuves reste faible. Actuellement, cette pathologie semble le plus souvent dans les premières années de la vie relativement indolente, alors qu'à l'âge adulte, les manifestations cliniques sont potentiellement rapidement létales.

Structure et fonction de GATA2 dans l'hématopoïèse

GATA2 est un des 6 membres de la famille des facteurs de transcription GATA, caractérisés par leur capacité à se lier à une région d'ADN de type (A/T)GATA(A/G) [6,7]. Cette capacité de la protéine GATA2 est liée à la présence de deux domaines contigus à doigt de zinc. Le domaine proximal participe à des interactions protéiques tandis que le domaine distal se fixe sur l'ADN. GATA2 possède également deux domaines de transactivation (Fig. 1). GATA2 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques (cellules souches hématopoïétiques, progéniteurs multipotents, progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytes, polynucléaires éosinophiles et mastocytes), les fibroblastes, les cellules endothéliales musculaires, pulmonaires et embryonnaires cérébrales et hépatiques. GATA2 régule le renouvellement et la survie des cellules souches hématopoïétiques : les souris invalidées pour *Gata2* (*Gata2*^{-/-}) meurent après 10 à 11 j de gestation et les cellules souches hématopoïétiques issues de ces animaux présentent des défauts d'auto-renouvellement et de prolifération [8]. L'hétérozygotie de *Gata2* (*Gata2*^{+/-}) dans le modèle murin conduit à une homéostasie anormale des cellules souches hématopoïétiques, avec une diminution des précurseurs de la lignée granulo-macrophagique [9].

GATA2 est situé en position q21.3 sur le bras long du chromosome 3. Il existe 2 isoformes du gène, produits par épissage alternatif, P23769-1 (séquence canonique) et P23769-2 (délétion 340-353). Sa transcription se réalise

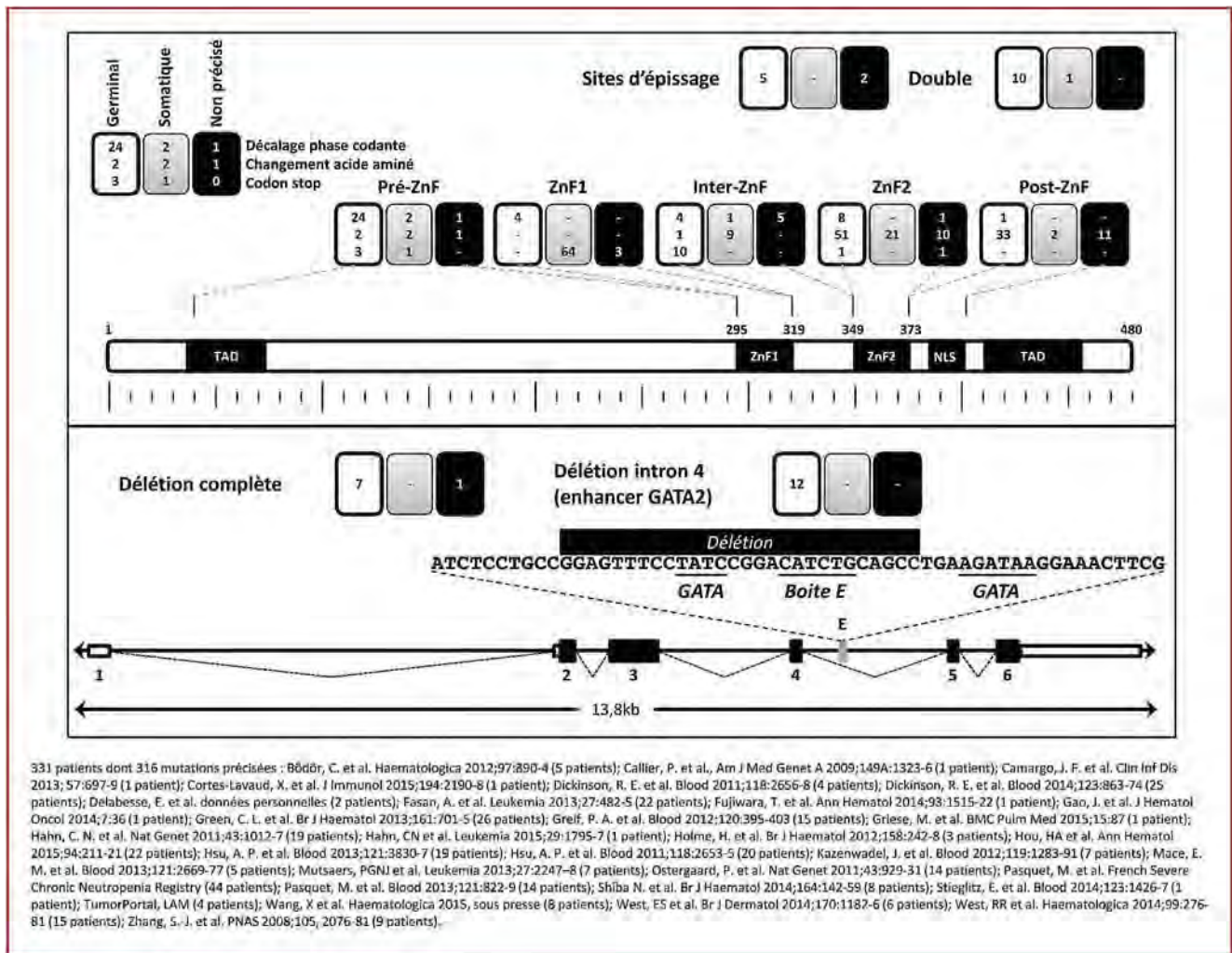


Figure 1. Localisation des mutations de GATA2 par rapport aux principaux domaines de la protéine de 480 acides aminés (TAD : domaine de transactivation ; ZnF1 : premier doigt de zinc ; ZnF2 : second doigt de zinc). Les mutations germinales sont indiquées en blanc et celles somatiques en gris, non précisées en noir. Les délétions complètes et de l'intron 4 sont aussi indiquées. Les doubles mutations correspondent à l'existence de 2 mutations chez un même malade.

sous le contrôle de 2 promoteurs, de 2 enhanceurs situés en -110 kb du site d'initiation et au niveau de l'intron 5 et grâce à de nombreux facteurs de transcription comme ETS1, BMP4, CEBPA, NOTCH1, SPI1/PU.1 et MECOM/EVI1 [10]. GATA2 participe lui-même à une boucle d'auto-contrôle positif en compétition avec GATA1 qui réprime la transcription de GATA2 (« GATA switch »). Les expressions de GATA2 et de GATA1 sont séquentielles durant les phases précoces et tardives de la différenciation hématopoïétique (GATA2, puis GATA1), ces deux facteurs de transcription se fixent aux mêmes régions d'ADN avec des propriétés antagonistes (répression ou activation de la transcription) [11]. L'absence d'expression de GATA2 permet quand même une différenciation myéloïde et érythroïde terminale tandis que l'absence de GATA1 conduit à un blocage de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire [12]. Le maintien de l'expression de GATA2 aboutit à un blocage de la différenciation hématopoïétique.

GATA2 coopère avec d'autres facteurs de transcription comme TAL1, LMO2, LYL1, ERG, FLI1 et RUNX1 pour réguler

des gènes de prolifération et de différenciation hématopoïétiques [13]. GATA2 peut être soumis à phosphorylation, acétylation et sumoylation et est rapidement détruit par ubiquitination [14].

Mutations de GATA2 chez l'homme

Description et localisation des mutations

Les mutations germinales hétérozygotes de GATA2 sont hétérogènes et réparties sur tout le gène : mutations faux sens localisées préférentiellement sur les doigts de zinc (environ 2/3 des cas), mutations non-sens ou décalage du cadre de lecture en amont de ce domaine, délétions complètes et partielles du gène [5] et délétion intronique localisées au niveau de l'enhancer de l'intron 5 [15] (Fig. 1). La détection des mutations repose sur le séquençage complet du contenu génique des séquences codantes 1 à 398, ainsi que de l'enhancer de l'intron 5, aucune mutation n'ayant

Tableau 1 Principaux éléments clinico-biologiques devant faire évoquer au clinicien une mutation de GATA2 au clinicien.

Eléments de diagnostic	Particularités clinico-biologiques	Fréquence dans le registre français des neutropénies	Fréquence dans les cohortes publiées ^a
Histoire familiale de LAM, de MDS, de cytopénies ou de déficit immunitaire	Décès précoce suite à une hémopathie myéloïde ou décès infectieux avant 18 ans	11/19 familles évaluables	NE
Atteinte hématologique	Thrombopénie	8 %	MDS/AML
	Anémie	4 %	20–50 % diagnostic
	Macrocytose	16 %	90 % dans l'évolution
	Neutropénie chronique modérée	47 %	
	MDS	61 %	
	LAM	22 %	
	LAL	3 %	
	Aplasie médullaire Leucémie myélomonocytaire juvénile chronique	3 %	
	1,5 %		
Infections répétées à virus (HPV, Herpès, grippe, EBV, CMV, varicelle)	MonoMac Syndrome		
Mycobactéries atypiques	Monocytopénie	61 %	78 % 86 % 82 %
	Lymphopénie B	80 %	HPV 60–70 % HSV, CMV, EBV, VZV 10–40 %
Fongiques (aspergillose, candidose)	Lymphopénie NK		Infection fongique
	Hypogammaglobulinémie modérée ou dosage des immunoglobulines normal	70 %	4–16 % Mycobactéries
Infections bactériennes récurrentes des voies aériennes hautes	Otitis, sinusites	61 %	20–50 %
Verrues	Association HPV (génitales et extra-génitales)	40 %	10–20 %
	Oncogénèse		50 %
Lymphœdème	Enfance ou adolescence	11 %	11–20 %
	Postgreffe possible		
Atteinte pulmonaire	Protéïnose alvéolaire à anticorps anti GM-CSF négatifs	1,5 %	18 % 50 %
	27 %		10 %
	Diffusion pulmonaire perturbée		14 %
	Hypertension artérielle pulmonaire Infections bactériennes répétées		
Oncogénèse	Cancers EBV (foie) ou HPV + (col)	4 % 1,5 %	20–35 % néoplasie intraépithéliale
	Cancer de la peau Cancer du sein > 35 ans		11 %
			22 %
CardioVasculaire	Dissection, infarctus du myocarde Thromboses (facteurs confondants)	3 % 6,5 %	25 %
Surdité	Congénitale	1,5 %	20–76 % audiogrammes anormaux
Cutanée	Panniculite, érythèmes noueux Arthrite	13 %	30 %
Autres	Leucoencéphalite multifocale progressive (JCV) Malformations urogénitales, retard intellectuel	1,5 %	0 %
	Accouchement prématuré, fausses couches		33 % 14 %
	Hypothyroïdie		

NE : non évaluable.

^a Collin et al. (2015), [25].

été rapportée en 5' ou 3' UTR. En seconde approche, la recherche de délétion par PCR quantitative doit être réalisée. Les mutations germinales décrites sont de novo ou sont transmises sur un mode autosomique dominant. Des mutations somatiques de GATA2 associées à des mutations d'autres facteurs de transcription, comme CEBPA, ont été décrites dans le développement de LAM.; ce sont très majoritairement des mutations faux-sens affectant les deux domaines en doigt de zinc (Fig. 1).

Aspect fonctionnel des mutations de GATA2

Actuellement, peu d'éléments fonctionnels permettent de comprendre le lien entre les mutations de GATA2 et la variabilité du phénotype hématologique et immunologique tout au long de la vie, qu'on peut assimiler à une immuno-sénescence prématurée, parfois au sein d'une même famille. L'absence de corrélation génotype/phénotype et l'existence des rares « porteurs sains » (malades asymptomatiques entre la 5^e et 6^e décennie) interroge sur le rôle des mutations de ce facteur de transcription. La variété des mutations, la prévalence des cytopénies/hypoplasies médullaires et quelques publications récentes suggèrent préférentiellement un mécanisme d'haploinsuffisance même si un effet dominant négatif peut être évoqué pour des mutations faux sens situées au niveau des doigts de zinc [1]. Récemment l'analyse fonctionnelle de la mutation germinale p.Arg396Gln située sur le 2^e doigt de zinc semble remettre en question l'hypothèse initiale de Hahn sur un effet dominant négatif de ce type de mutant. Des résultats in vitro montrent simplement une diminution de la boucle d'auto-contrôle du gène GATA2 sur ses propres régions régulatrices et une modification du phénotype des cellules progénitrices in vitro poussées vers la différenciation granulocytaire [16]. Un effet gain de fonction a aussi été rapporté pour la mutation somatique L359V décrit au moment de la transformation blastique dans la leucémie myéloïde chronique [17].

Seule l'inactivation conditionnelle d'un *enhancer* ou la délétion hétérozygote d'un site de liaison à l'ADN a été étudiée dans un modèle murin, conduisant à un défaut d'hématopoïèse précoce fœtale et adulte chez la souris [18,19]. L'hypothèse actuelle serait une attrition progressive du réservoir de cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs débutant dès l'embryogenèse et se poursuivant pendant l'enfance et la période adulte jeune. Mace et al. rapporte le rôle majeur de GATA2 dans la maturation des cellules NK, et spécifiquement dans le maintien du pool CD56bright [20]. Le déficit immunitaire en rapport avec des mutations hétérozygotes de GATA2 s'accompagne d'anomalie de la signalisation de la voie CXCR4-CXCL12 similaires à celles observées dans le syndrome WHIM [21,22].

GATA2 semble également essentiel au développement vasculaire lymphatique endothélial : son inactivation conduisant chez la souris à un décès précoce (E16.5) des embryons par œdème et hémorragie (modélisation de la délétion de l'enhancer +9,5 kb, mutation retrouvée chez un patient MonoMac) [18,19,23].

Syndromes cliniques associés aux mutations germinales de GATA2

Actuellement, 3 cohortes sont publiées dans la littérature : France 14 patients [5] (2013), États-Unis (NIH) 57 patients [24] (2014) et Royaume-Uni 30 patients [25] (2015). Au total, 331 patients ont été décrits à ce jour dans la littérature dont 177 patients présentant une mutation germinale. Des mutations germinales de GATA2 (délétions partielles ou totales, mutations ponctuelles non-sens ou faux sens, décalage du cadre de lecture) ont été décrites récemment associées à des cytopénies, la survenue d'hétopathies myéloïdes, des déficits immunitaires (syndrome MonoMac), à un lymphœdème et à des présentations cliniques variées : pulmonaire, oncologique, vasculaire, surdité. Ces manifestations peuvent être présentes chez un même malade successivement et touchent les patients à tout âge, avec une transmission autosomique dominante et une pénétrance forte. La moitié des patients sont symptomatiques à 20 ans et 84 % à 40 ans : la survie globale est évaluée à 45 % à 60 ans [24].

Sur le plan clinique, on retrouve chez une partie des malades la récurrence d'infections virales (papillomavirus et virus du groupe Herpès en particulier), d'infections à mycobactéries atypiques, d'infections bactériennes du tractus respiratoire (*Haemophilus* et pneumocoque notamment) et des infections fongiques invasives. L'histoire clinique peut montrer la prédominance d'un aspect ou d'un autre, mais associe souvent sur le plan immunologique une ou plusieurs cytopénies modérées, une monocytopenie, une lymphopénie et un déficit en cellules NK. L'évolution vers une hétopathie maligne myéloïde peut être précoce ou à l'âge adulte. Le Tableau 1 présente les différents éléments clinico-biologiques évocateurs de mutation de GATA2 chez un même malade ou une famille.

Manifestations hématologiques

Les hémogrammes des patients sont évocateurs de mutation GATA2 quand ils associent une monocytopenie souvent profonde, une neutropénie modérée associée ou non à d'autres cytopénies, une macrocytose et des anomalies immunologiques (lymphopénie NK et B). L'hémogramme évolue avec l'âge et les cytopénies peuvent apparaître tardivement. L'évolution clinique est marquée par un risque majeur de transformation clonale myéloïde sous forme de MDS ou de LAM [1,5,26]. Entre 30 et 50 % des patients sont diagnostiqués au stade d'hétopathie maligne ; le risque cumulé de transformation maligne est parmi les plus élevés parmi les syndromes de susceptibilité génétique aux leucémies atteignant 90 % à l'âge de 60 ans [24,25]. Dans notre série initiale de 14 patients et apparentés, l'incidence cumulative d'hétopathies myéloïdes est de 54 % à 20 ans et 73 % à 30 ans [5], avec un possible biais lié au recrutement. L'étude récente des 62 patients du registre français permet de confirmer l'importance de ce risque (données en cours de publication, Fig. 2). Le calcul de ce risque de myélodysplasie/leucémie pose des questions de méthodes. En effet, à peine 4 ans après la description de cette pathologie, les effectifs des 3 cohortes disponibles ne dépassent pas au total 150 patients au monde et on peut craindre des biais

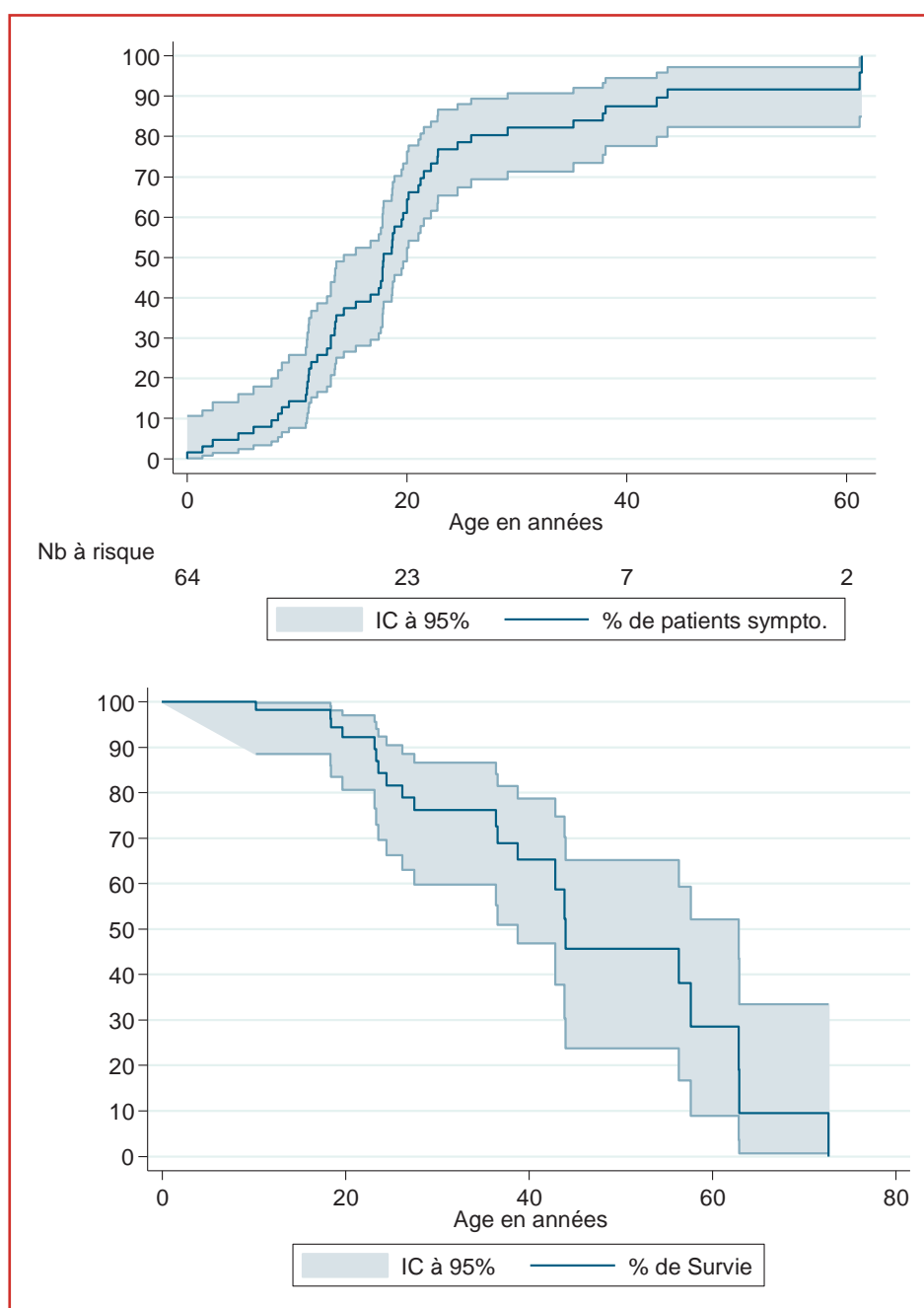


Figure 2. Courbe de Kaplan-Meier montrant (A) le risque de myélodysplasies/leucémies et (B) la survie globale leucémies parmi les 62 cas français identifiés (octobre 2015).

de recrutement, *GATA2* ayant été étudié particulièrement en présence d'une myélodysplasie familiale. Mais la concordance des résultats des 3 cohortes plaide pour considérer que ce risque est avéré. Il n'existe pas de corrélation génotype/phénotype formelle même si la majorité des patients présentant une hémopathie myéloïde présentent une mutation faux sens ou décalant le cadre de lecture au niveau d'un des deux domaines en doigt de zinc.

L'examen du frottis de moelle au cours du suivi de ces patients retrouve des signes de dysplasie dans plus de 80% des cas et l'hypocellularité est pratiquement constante. Les mégacaryocytes sont souvent nombreux mais atypiques

quelque soit le statut hématologique. La biopsie ostéo-médullaire montre souvent une augmentation de la trame réticulinique. Un excès de LGL a été observé dans un certain nombre de cas. On doit souligner que l'aspect médullaire observé, même sans anomalies cytogénétiques identifiées ni anomalie hématologique majeure («état stable»), est profondément anormal, pratiquement toujours considérée comme dysplasique ce qui rend difficile la distinction entre phase stable de la maladie et transformation clonale. Cette problématique est la même que dans d'autres syndromes d'insuffisance médullaire constitutionnels, comme la maladie de Fanconi, la maladie de Shwachman-Diamond et

dans la majorité des neutropénies congénitales. Une relecture par des cytologistes spécialisées est recommandée. L'évolution vers une hémopathie maligne est associée à la survenue d'anomalies clonales (jusqu'à 85 % des cohortes). Les anomalies cytogénétiques les plus fréquemment observées sont une monosomie 7 et/ou une trisomie 8 acquises, dans 7 à 25 % des cas. L'acquisition d'anomalies moléculaires somatiques additionnelles reste une voie d'étude indispensable à la compréhension des mécanismes de leucémogénèse. Des mutations de *ASXL1* ont été initialement décrites associées à une monosomie 7 chez ces patients [26,27]. D'autres mutations somatiques ont été rapportées chez des patients ayant des mutations hétérozygotes de *GATA2* et présentant des LAM et/ou MDS familiales parmi lesquelles *NRAS*, *RUNX1*, *STAG2*, *IDH2*, *TP53*, et *SETBP1* [28]. L'analyse par séquençage d'exome chez ces patients permettra probablement de mieux comprendre les bases moléculaires du développement d'hémopathies malignes chez ces patients.

La suspicion de mutation hétérozygotes de *GATA2* en contexte hématologique doit être évoquée chez des patients présentant une monocytopenie, des cytopénies à moelle pauvre, un syndrome myélodysplasique avant l'âge de 50 ans, ce d'autant que la moelle est hypoplasique et qu'il existe des anomalies extra-hématologiques évocatrices ou des antécédents familiaux. Des cas d'aplasies médullaires ont été rapportés mais la plupart sont atypiques de part la richesse de la moelle (hypoplasie sans aplasie vraie), la présence de signes de dysplasie (notamment mégacaryocytaire), la fréquence des anomalies cytogénétiques associées et la présence d'une lymphopénie B et NK profonde [29].

Deux cas de leucémies aiguës lymphoblastiques ont été rapportés chez des patients présentant une mutation *GATA2* et un cas de leucémie myélomonocytaire juvénile chronique a été observé chez un nourrisson avec une résolution spontanée dans la petite enfance (données personnelles non publiées). Cela incite à reconsidérer le rôle potentiel des mutations de *GATA2* dans le développement d'hémopathie lymphoïde et le rôle de ce facteur de transcription à un stade très précoce de l'hématopoïèse.

Déficit immunitaire ou MonoMAC

Le déficit immunitaire associé aux mutations de *GATA2* est complexe, affectant à la fois l'immunité innée et adaptative, de manière variable selon les individus. Ce déficit a été décrit sous le terme MonoMAC [3] et combine des déficits en cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B et Natural Killer (NK)/DCML deficiency [2,3,30,31]. Sur le plan clinique, les patients présentent une susceptibilité particulière aux infections virales à papillomavirus cutanées ou génitales (plus de 70 % des patients), virus du groupe herpès dont EBV, CMV, HSV (10 à 35 %), grippe. Ce déficit immunitaire est aussi caractérisé par une susceptibilité aux infections à mycobactéries environnementales (*Mycobacterium avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *genavensae*.), avec une fréquence variable selon le recrutement institutionnel (jusqu'à 50 % dans la cohorte américaine et 25 % dans la cohorte française) responsables d'une morbi-mortalité importante [3,24]. On retrouve chez ces patients un sur-risque d'infections fongiques, notamment aspergillose invasive, histoplasmoses et candidoses systémiques

observées le plus souvent au décours des chimiothérapies dans le traitement des hémopathies [2,31,32]. Ces dernières sont responsables d'un morbi-mortalité importante. Des infections bactériennes sont aussi rapportées chez environ 50 % des patients : bactériémie, infections cutanées, pneumopathies et infections digestives plus rarement, certaines graves à *Clostridium difficile*. Un cas de leucoencéphalite multifocale progressive (LEMP) a été observé chez un patient adulte de la cohorte française, avec la mise en évidence du virus JC dans les prélèvements biopsiques postmortem.

Sur le plan biologique, la mise en évidence de ce déficit immunitaire demeure délicate, car le phénotypage lymphocytaire classique, les tests fonctionnels lymphocytaires et le dosage pondéral des immunoglobulines sont généralement normaux ou montrent une discrète hypogammaglobulinémie (portant sur les sous-classes IgG2 et IgG4) voire une hypergammaglobulinémie. La lymphopénie B affecte les précurseurs médullaires et les cellules naïves, mais peu ou pas les cellules B mémoires et plasmocytaires, permettant le maintien d'une réponse humorale [33]. La lymphopénie NK est fréquente et profonde, avec un déficit électif de la population CD56^{bright}, cellules NK immatures [20]. La monocytopenie est fréquente, souvent profonde mais non constante, la neutropénie est variable (profonde, modérée ou absente), avec une grande variabilité intrafamiliale y compris dans un couple de jumelles monozygotes. Du fait de leur facilité à être détectées sur un simple hémogramme et avant tout autre complication, l'anémie, la neutropénie chronique et la monocytopenie peuvent conduire à un diagnostic précoce (grâce au phénotypage lymphocytaire et parfois à un interrogatoire familial un peu poussé), avant l'apparition de manifestations infectieuses ou d'une hémopathie maligne [5].

Atteintes lymphatiques et cardiovasculaires

GATA2 est fortement exprimé au niveau de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, en particulier du système vasculaire lymphatique, ainsi que dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Une mutation hétérozygote de *GATA2* au niveau de l'enhancer situé dans l'intron 5 conduit chez la souris à un décès précoce (E16.5) des embryons par œdème et hémorragie confirmant son rôle essentiel au développement vasculaire lymphatique endothélial [18,19]. Des mutations hétérozygotes de *GATA2* ont été identifiées dans le syndrome d'Emberger, confirmant le lien connu chez l'animal entre l'atteinte vasculaire lymphatique le facteur de transcription *GATA2*. La publication initiale d'Emberger et al. rapportait dans une famille de la région de Montpellier l'association lymphœdème primaire/surdité de perception/prédisposition au développement de LAM [34]. Le lymphœdème peut être uni- ou bilatéral et survenir à tout âge, avant ou après l'apparition d'une hémopathie, voire après transplantation médullaire [5]. Parmi les patients porteurs de mutations de *GATA2*, environ 10 à 20 % ont cette présentation [24]. Des cas de thromboses sont aussi rapportés jusqu'à 25 % dans la cohorte américaine, avec cependant de nombreux cofacteurs associés (prédispositions génétiques, contexte d'hémopathie, d'allogreffe, lymphœdème des membres inférieurs), rendant difficile l'imputabilité unique des mutations de *GATA2* chez ces patients. L'observation de cas isolés de dissections

aortiques, d'infarctus précoces chez ces patients et d'une incidence anormalement élevée de mort subite chez les apparentés suggèrent une atteinte de l'endothélium vasculaire plus large, rôle au niveau de l'endothélium vasculaire qui est démontré dans une publication de 2012 [35].

Poumon

À côté des maladies infectieuses déjà évoquées (infections à mycobactérie environnementale, infections fongiques), une protéinose alvéolaire, probable conséquence d'un défaut de phagocytose des macrophages, peut être associée aux mutations de *GATA2*. Celle-ci peut être la porte d'entrée dans la maladie, avec comme caractéristique de s'accompagner de l'absence d'anticorps anti-GM-CSF et de ne pas répondre à l'administration sous-cutanée ou inhalée de GM-CSF [36]. Les lavages pulmonaires peuvent être partiellement efficaces. Une hypertension artérielle pulmonaire est parfois associée. La physiopathologie reste mal comprise, notamment la présence de macrophages alvéolaires dans le liquide de lavage alvéolaire et dans les biopsies pulmonaires, en l'absence de monocytes circulants, souligne une probable conséquence fonctionnelle liée aux mutations de *GATA2* sur l'homéostasie macrophagique pulmonaire [30].

Une atteinte pulmonaire est souvent présente chez les patients porteurs d'une mutation de *GATA2* (jusqu'à 50 % des cas décrits), bien qu'inconstamment recherchée : anomalies de diffusion et de ventilation (syndrome restrictif, obstructif ou mixte). Le traitement par allogreffe de moelle osseuse, quand il est réalisé avant la survenue de complications menaçant le pronostic vital, permet une amélioration de la fonction pulmonaire [37] et parfois une régression de la protéinose alvéolaire.

Tumeurs solides

En plus des hémopathies malignes, des tumeurs solides sont observées, souvent conséquences des infections à papillomavirus (dysplasies intra-épithéliales, carcinomes vulvaires, cancer de l'oropharynx), à virus d'Epstein-Barr (lymphome non Hodgkinien, leiomyosarcome, cancer du foie) [31,35,38], ou récemment à poliovirus (*Merkel cell carcinoma*) [39]. Des cas de tumeur desmoïde, adénocarcinome du pancréas et du rein et adénome de Conn ont été rapportés. Il est intéressant de noter que 22 % des femmes de plus de 35 ans ont développé un cancer du sein (dont une avait une mutation *BRCA2* associée) dans la cohorte du NIH [24], fréquence que nous ne retrouvons pas dans la cohorte française.

Atteintes dermatologiques

Les atteintes dermatologiques peuvent être très variées, soulignant la nécessaire sensibilisation des dermatologues à la reconnaissance de ce syndrome clinico-biologique. Elles relèvent souvent d'une étiologie infectieuse, et c'est le cas des verrues récurrentes génitales et/ou des membres liées à l'HPV, présentes fréquemment au début de l'histoire clinique, et pouvant toucher jusqu'à 50 % des patients selon les cohortes [24]. Les autres lésions retrouvées peuvent être un érythème noueux, une panniculite et sont elles aussi souvent associées à une infection chronique à

mycobactérie, fongique et/ou à un lymphœdème persistant. Des cas de cancers cutanés (spino-, basocellulaire, mélanome) ont aussi été décrits chez environ 10 % des patients [24,25].

Autres atteintes

Des cas de surdité ont été rapportés liées aux mutations de *GATA2*, soulignant le rôle clé de ce gène au niveau des canaux semi-circulaires. La prévalence est variable selon les cohortes, jusqu'à 20 %, et plus faible dans la cohorte française [5,24,25]. Il est à noter que la non réalisation systématique d'audiogramme sous estime très probablement ce chiffre.

De nombreuses femmes ont présenté des fausses couches, précoces ou tardives, comme cela a été le cas à 3 reprises chez notre famille index [5] et il est difficile d'avoir une idée plus précise sur la fréquence de ces complications obstétricales, car ces informations ne figurent pas toujours dans l'anamnèse clinique. Le NIH rapporte un chiffre de 33 % dans leur cohorte américaine [24]. L'implication de *GATA2* au niveau de l'utérus de souris gestantes pourrait expliquer l'importance de ce gène chez les mammifères, dont l'homme, lors de la gestation [40].

Une hypothyroïdie peut être observée mais sa prévalence est proche de celle de la population générale, rendant moins certain le lien avec la mutation de *GATA2*. Celles-ci sont aussi parfois associées à des malformations de l'appareil urogénital et à un retard intellectuel dans les délétions larges du gène, emportant probablement d'autres gènes contigus.

Survie globale et évolution

La survie globale des patients ayant des mutations hétérozygotes de *GATA2* est liée à la survenue d'événements oncogéniques, et notamment d'hémopathies malignes, ainsi qu'aux complications du déficit immunitaire : elle atteint 77 et 45 % aux âges respectifs de 40 et 60 ans dans la cohorte du NIH chiffres similaires à ceux retrouvés dans la cohorte française, néanmoins un peu plus péjoratifs (en cours de publication 65 % à 40 ans et 35 % à 60 ans, Fig. 2).

Diagnostics différentiels

Lorsque la présentation clinique est hématologique, associant de nombreuses hémopathies myéloïdes familiales, le diagnostic est habituellement évoqué après le screening de gènes comme *CEBPA* et *RUNX1* et la recherche de manifestations associées. Lorsque la présentation clinique est partielle, et notamment immunologique, vasculaire ou pulmonaire, certains diagnostics différentiels doivent être évoqués :

- les autres étiologies de syndrome MonoMac : WHIM, *DOCK8*, axe *IL12/IFN* ;
- les myélodysplasies « sporadiques » ;
- les formes constitutionnelles d'insuffisance médullaire dont téloméropathies ;
- la protéinose alvéolaire et défaut de surfactant ;
- le lymphœdème constitutionnel.

Prise en charge thérapeutique des patients porteurs de mutations GATA2 : recommandations du « club GATA2 »

Prise en charge et suivi des patients

L'identification de mutations hétérozygotes de *GATA2* depuis 2011 dans plusieurs syndromes cliniques différents, n'a pas permis d'obtenir de consensus international, sur la prise en charge de ces patients qui cumulent de multiples pathologies dont certaines menacent leur pronostic vital (Tableau 2). Toutefois, en France, en 2013, un groupe d'experts francophone (France et Belgique) en hématologie, immunologie et génétique ont initié des réunions bi-annuelles afin de discuter aussi bien de la prise en charge des patients que des travaux de recherche dans ce domaine.

Concernant les atteintes infectieuses, compte tenu de la prévalence des atteintes à HPV et à mycobactéries atypiques, une vaccination très précoce contre l'HPV et une prophylaxie contre les mycobactéries environnementales doit être discutée, rejoignant les recommandations américaines. Un traitement anti-infectieux précoce et large sera envisagé pour ces patients qui cumulent un risque viral, bactérien, d'infections mycobactériennes et fongiques. Il est justifié de faire une dosage pondéral des Ig et des sous-classes d'IgG, pour améliorer la réponse immunitaire en vaccinant ou revaccinant ces patients contre le pneumocoque et l'hémophilus, et éventuellement discuter de substitutions en Ig ou de prophylaxie antibiotiques.

Dépistage génétique des patients et apparentés

La reconnaissance de l'ensemble très large des manifestations cliniques associées aux mutations de *GATA2* reste un défi pour les cliniciens et touche de nombreuses spécialités au-delà des immuno-hématologues qu'il convient de sensibiliser : dermatologues, pneumologues, ORL, internistes, infectiologues, rhumatologues, gynécologues et cardiovasculaires.

Après confirmation moléculaire, une enquête familiale est nécessaire compte tenu du caractère dominant de la pathologie, de la variabilité des présentations cliniques et implique l'ensemble de la famille, ascendant, fratrie et descendance. Une telle démarche doit être faite dans un cadre multidisciplinaire et comporte une consultation pour conseil génétique en présence d'un généticien, d'un psychologue et de l'hémo-immunologiste référent. Un consentement éclairé après information sera proposé aux patients mineurs et majeurs à chaque fois qu'une analyse génétique constitutionnelle sera envisagée (loi de bioéthique).

L'enjeu de l'enquête familiale se situe à 2 niveaux :

- le cas le plus urgent est celui d'un don intrafamilial de cellules souches hématopoïétiques pour allogreffe de moelle. Le statut génétique du donneur potentiel doit être connu le plus rapidement possible afin d'envisager une greffe à partir du fichier si la fratrie est porteuse de la mutation. La normalité de l'hémogramme et l'absence d'anomalies cliniques ne sont pas suffisantes pour exclure le diagnostic, compte tenu de l'existence de rares porteurs asymptomatiques ;

- la deuxième circonstance est celle de l'étude des cas non symptomatiques dans la famille, avec une attention particulière pour les mineurs, pour lesquels un bénéfice individuel direct doit être évalué. Quoique l'expérience de la détection des cas asymptomatiques et de leur suivi soit forcément récente, l'avis des participants du groupe de travail est qu'il existe un intérêt médical à connaître le plus tôt possible dans la vie des patients leur statut *GATA2*. L'intérêt d'un tel diagnostic est d'organiser un suivi médical pour dépister les premiers signes d'une atteinte médullaire, d'un déficit immunitaire afin de mettre en place une prophylaxie. Il s'agit bien sûr d'une proposition pour les apparentés qui doivent bénéficier à la fois d'information, de temps et de supports psychologiques et bien sûr conservent le droit de refuser un dépistage génétique. Devant la gravité d'un tel tableau clinique, se pose aussi la question du diagnostic prénatal pour ces familles. À ce jour, un premier cas de diagnostic prénatal pour mutation de *GATA2* a été organisé.

Prise en charge des complications hématologiques

Lors de la survenue de LAM et/ou de MDS, souvent associées à des anomalies cytogénétiques, l'allogreffe de moelle osseuse apparaît indiquée, y compris avec donneur non apparenté ou unité de sang placentaire, comme cela a été proposé par de nombreuses équipes. Environ une trentaine de patients allogreffés ont été rapportés à travers le monde, pour des hémopathies et/ou un déficit immunitaire, avec de bons résultats globaux post-allogreffe si l'on prend en compte les motifs immuno-hématologiques ayant motivé la greffe [37]. Quatorze patients allogreffés ont été rapportés en 2014 par l'équipe américaine, présentant un tableau clinique de syndrome MonoMAC sans hémopathie transformée (MDS ou cytopénie avec moins de 5 % de blastes dans la moelle). Un conditionnement atténué leur a été proposé, adapté au type de donneur (donneur apparenté ou non, cordon, greffe en situation haploidentique) : 8 patients sont vivants avec une médiane de suivi de 3,5 ans et une reconstitution immunologique, 2 patients ont présenté un rejet, 1 une évolution clonale post allogreffe, et 3 sont décédés de toxicité post allogreffe. Parmi les patients, 57 % ont présenté une GVH aiguë, 65 % des complications infectieuses et 3 décès sont attribuables directement à des complications infectieuses [41]. Dans la cohorte des 62 patients français (papier en cours de soumission), 21 patients ont été allogreffés dont 20 pour des complications hématologiques sévères (MDS, LAM, aplasie médullaire) avec une médiane de survie de 63 % à 5 ans, ce qui montre les bons résultats de l'allogreffe de moelle dans ces conditions. Compte tenu du risque de complications infectieuses et/ou de GVH post-allogreffe, ainsi que du risque de rejet et de réapparition d'un clone malin, une réflexion est menée au sein du « Club GATA2 » afin de proposer au patient le type de conditionnement le plus adapté à son tableau clinique et aux comorbidités prégreffe (conditionnement atténué ou myéloblatif).

Avant l'allogreffe, la prise en charge hématologique vise à être le plus conservateur possible et à éviter les chimiothérapies intensives, compte tenu des complications

Tableau 2 Résumé des recommandations de suivi et de prise en charge thérapeutique du complexe GATA2 (septembre 2015). Les données concernant la surveillance des hémogrammes sont indicatives et dépendent des anomalies hématologiques observées au diagnostic et lors du suivi.

Âge et période	Diagnostic	0–10 ans	10–20 ans	Au-delà de 20 ans
<i>Explorations complémentaires</i>				
Hémogramme (VGM)	+	Tous les ans	Bi-annuel	Bi-annuel
Immunophénotypage lymphocytaire dosage pondéral des Ig et sous-classes sérologies vaccinales	+	1 tous les 2 ans	Tous les ans	Tous les ans
Myélogramme avec cytogénétique éventuellement étude moléculaire	+	1 tous les 5 ans et selon hémogramme	1 tous les 2 ans et selon hémogramme	1 par an et selon hémogramme
Audiogramme	+	Selon clinique		
Examen pulmonaire, TDM, EFR	+	Une fois	Bilan tous les 5 ans	Radio thorax annuelle
Examen dermatologique	+	Selon clinique		
Consultation génétique pour le patient et apparentés	+	Selon demande familiale		
Examen de suivi à visée recherche biothèque sang et moelle	+	Selon protocole ouvert si possibilité de prélèvement		
Échographie cardiaque +	+	Une fois	Tous les 5 ans	
<i>Thérapeutique</i>				
Prophylaxie infectieuse		Azythromycine à discuter si monoMAC vaccin Gardasil précoce et pneumocoque (Prévenar13 puis pneumo23) (HIB) 400 mg/kg/3 semaines si infections bactériennes		
Immunoglobulines IV ou sous-cutanées		Voir recommandations spécifiques		
MDS leucémie		Selon germes identifiés		
Mycobactérie		Avis vasculaire et dermatologique spécialisés		
Lymphœdème				

infectieuses extrêmement lourdes et fréquentes rencontrés avec des schémas classiques et en particulier l'induction des protocoles usuels de leucémie aiguë myéloblastique. Une prophylaxie systématique par antibiotique et IgIV sera proposée chez les patients qui reçoivent une chimiothérapie pour leucémie aiguë. Le taux d'échec hématologique de ces traitements est de plus inhabituellement élevé. Au cas par cas, compte tenu de la toxicité des chimiothérapies conventionnelles et des comorbidités associées, l'utilisation d'agents déméthylants mérite d'être considérée, dans la perspective de proposer au patient une allogreffe dans les meilleures conditions possibles.

La morbi-mortalité excessive associée au traitement intensif des hémopathies malignes et leur échec fréquent, associés aux meilleurs résultats de l'allogreffe chez les patients qui n'ont pas d'excès de blastes incitent à proposer cette dernière de façon préemptive. Cependant la place de l'allogreffe de CSH préemptive reste discutée car si l'allogreffe permet de corriger le déficit immunitaire, la protéinose alvéolaire et de prévenir le risque d'évolution clonale, le risque de complications précoces potentiellement létales (en particulier infectieuses et liées à la réaction du greffon contre l'hôte (GVH)) ne permet pas à l'heure actuelle de la proposer chez des patients qui ne présentent pas d'anomalies hématologiques, de complications infectieuses ou pulmonaires menaçantes. Ceci semble particulièrement vrai chez les patients de plus de 35 ans dont la

survie postgreffe est significativement moins bonne (survie globale = 20 % si > 35 ans versus 80 % si < 18 ans dans le registre français, données non publiées).

Autres complications

La prise en charge des autres complications repose sur un travail pluridisciplinaire et doit être coordonné par l'hématologue référent qui réalise la surveillance clinique et de l'hémogramme bi-annuelle. Le traitement des verrues reste parfois complexe, ainsi que des atteintes cutanées souvent résistantes aux corticoïdes.

Conclusion

Initialement considérées comme associées à un syndrome de prédisposition aux hémopathies malignes, les mutations de *GATA2* sont associées à un phénotype clinique et biologique plus large, comprenant hémopathies malignes, hypoplasie ou aplasie médullaire, déficit immunitaire, maladie pulmonaire, et plus rarement atteintes dermatologiques, vasculaires, ORL et oncologiques. L'augmentation relative rapide du nombre de cas dans le registre français laisse à penser que la prévalence de cette pathologie est actuellement sous-diagnostiquée : du fait de l'impact thérapeutique de ce diagnostic, la recherche de cette

mutation doit être proposée à tous les patients présentant un phénotype compatible (en particulier hématologique, immunologique et pneumologique). Établir un diagnostic de mutation GATA2 au sein d'une famille reste un challenge scientifique et humain, permettant de mieux comprendre cette maladie, d'une part, mais surtout de proposer un dépistage et une prise en charge adaptée aux membres de la famille, d'autre part. La question de l'allogreffe de CSH pré-emptive reste la question la plus complexe actuellement et une meilleure compréhension physiopathologique de cette maladie permettra dans l'avenir de pouvoir répondre à ces questions. Par ailleurs, la reconnaissance de cette entité de prédisposition associée aux mutations de GATA2 ouvre de nombreuses problématiques en termes de conseil génétique et de diagnostic anténatal, et ce, compte tenu de la gravité de l'atteinte hématologique et du déficit immunitaire.

Composition du Club GATA2

Jean Donadieu ; Marlène Pasquet, Marie Lamant, Christine Bellanné Chantelot, Françoise Bachelierie ; Eric Delabesse ; Anna Maciejewski-Duval ; Viviana Marin-Esteban ; Marie Ouachee ; Jacinta Bustamante ; Flore Sicre de Fontbrune ; Claire Fieschi ; François Delhommeau ; Jean-Hugues Dalle ; Bertrand Isidor ; Hélène Poiriel ; Hélène Cavé ; Aurélie Caye-Eude ; Claude Preudhomme ; Stanislas Nimubona ; Eric Jeziorski ; Caroline Thomas ; Arnaud Petit ; Marion Strullu ; Vincent Barlogis ; Thierry Leblanc ; Sarah Beaussant-Cohen ; Pierre Rohrllich ; Thierry Lamy ; Stéphane Vignes ; Felipe Suarez ; Laurence Faivre ; Anne Sophie Brunel ; Abouchahla Wadih ; Louis Terriou ; Oana Balasanu ; Bernard Drenou ; B. Boistard ; Bruno Lioure ; J Gutnecht ; F. Monpoux ; D. Ranta ; F. Chabot ; Ahle Guido.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011;43:1012–7.
- [2] Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* 2011;118:2656–8.
- [3] Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* 2011;118:2653–5.
- [4] Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* 2011;43:929–31.
- [5] Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121:822–9.
- [6] Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:575–81.
- [7] Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 2000;1:57–64.
- [8] Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371:221–6.
- [9] Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, et al. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 2005;106:477–84.
- [10] Vicente C, Vazquez I, Conchillo A, et al. Overexpression of GATA2 predicts an adverse prognosis for patients with acute myeloid leukemia and it is associated with distinct molecular abnormalities. *Leukemia* 2012;26:550–4.
- [11] Dore LC, Chlon TM, Brown CD, White KP, Crispino JD. Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide GATA factor switching during hematopoiesis. *Blood* 2012;119:3724–33.
- [12] Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89:3636–43.
- [13] Wilson NK, Foster SD, Wang X, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 2010;7:532–44.
- [14] Hayakawa F, Towatari M, Ozawa Y, et al. Functional regulation of GATA-2 by acetylation. *J Leukoc Biol* 2004;75:529–40.
- [15] Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* 2013;121:3830–7.
- [16] Cortes-Lavaud X, Landecho MF, Maicas M, et al. GATA2 germline mutations impair GATA2 transcription, causing haploinsufficiency: functional analysis of the p.Arg396Gln mutation. *J Immunol* 2015;194:2190–8.
- [17] Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2076–81.
- [18] Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2012;122:3692–704.
- [19] Lim KC, Hosoya T, Brandt W, et al. Conditional Gata2 inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *J Clin Invest* 2012;122:3705–17.
- [20] Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, et al. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood* 2013;121:2669–77.
- [21] Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 2005;105:2449–57.
- [22] Balabanian K, Levoe A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest* 2008;118:1074–84.
- [23] Kazenwadel J, Betterman KL, Chong CE, et al. GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. *J Clin Invest* 2015;125:2979–94.
- [24] Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* 2014;123:809–21.
- [25] Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol* 2015;169(2):173–87.
- [26] Bodor C, Renneville A, Smith M, et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica* 2012;97:890–4.
- [27] West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica* 2014;99:276–81.

- [28] Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, et al. GATA2 and secondary mutations in familial myelodysplastic syndromes and pediatric myeloid malignancies. *Haematologica* 2015;100(10):e398–401.
- [29] Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. *Blood* 2015;125:56–70.
- [30] Bigley V, Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2011;96:1081–90.
- [31] Vinh DC, Patel SY, Uzel G, et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 2010;115:1519–20.
- [32] Camargo JF, Lobo SA, Hsu AP, et al. MonoMAC syndrome in a patient with a GATA2 mutation: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2013;57:697–9.
- [33] Chou J, Lutskiy M, Tsitsikov E, et al. Presence of hypogammaglobulinemia and abnormal antibody responses in GATA2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:223–6.
- [34] Emberger JM, Navarro M, Dejean M, Izarn P. Surdimutité, lymphœdème des membres inférieurs et anomalies hématologiques (leucoses aiguës cytopénies) à transmission autosomique dominante. *J Genet Hum* 1979;27:237–45.
- [35] Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood* 2012;119:1283–90.
- [36] Griesse M, Zarbock R, Costabel U, et al. GATA2 deficiency in children and adults with severe pulmonary alveolar proteinosis and hematologic disorders. *BMC Pulm Med* 2015;15:87.
- [37] Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, Freeman AF, et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Blood* 2011;118:3715–20.
- [38] Mutsaers PG, van de Loosdrecht AA, Tawana K, et al. Highly variable clinical manifestations in a large family with a novel GATA2 mutation. *Leukemia* 2013;27(11):2247–8.
- [39] Crall C, Morley KW, Rabinowits G, et al. Merkel cell carcinoma in a patient with GATA2 deficiency: a novel association with primary immunodeficiency. *Br J Dermatol* 2015, <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.14062>.
- [40] Rubel CA, Franco HL, Jeong JW, Lydon JP, DeMayo FJ. GATA2 is expressed at critical times in the mouse uterus during pregnancy. *Gene Expr Patterns* 2012;12:196–203.
- [41] Grossman J, Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1940–8.

GATA2, un nouvel oncogène des leucémies aiguës myéloblastiques sporadiques et familiales

GATA2, a new oncogene of sporadic and familial acute myeloid leukemias

Marlene Pasquet^{1,2}, Christine Bellanné-Chantelot³, Suzanne Tavitian^{1,4}, Naïs Prade^{1,5}, Cyril Broccardo², Françoise Bachelier⁶, Jean Donadieu^{7,8}, Éric Delabesse^{1,5,9}

¹ Service d'oncologie pédiatrique, CHU Toulouse Purpan, Toulouse, France

² INSERM U1037, centre de recherche sur le cancer de Toulouse, 31024, Toulouse, France

³ Département de génétique, hôpitaux universitaires Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France

⁴ Service d'hématologie Adultes, Institut universitaire de cancérologie de Toulouse, site Oncopôle, Toulouse, France

⁵ Laboratoire d'hématologie, Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse, site Oncopôle, Toulouse, France

⁶ INSERM UMR S996, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Université Paris-Sud, Clamart, France

⁷ service d'hématologie, Hôpital Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France

⁸ Registre français des neutropénies chroniques sévères, hôpital Trousseau, Paris, France

⁹ Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

<delabesse.eric@iuct-oncopole.fr>

Hématologie

Tirés à part : É. Delabesse

Résumé

Récemment, plusieurs équipes dont la nôtre ont identifié des mutations germinales du facteur de transcription GATA2 associées à des syndromes myélodysplasiques (MDS) et leucémies aiguës myéloïdes (LAM) familiales. Les mutations germinales de GATA2 sont également retrouvées dans des déficits des cellules NK, des monocytes et des polynucléaires neutrophiles et de lymphœdèmes (syndrome d'Emberger) évoluant fréquemment en MDS et LAM. GATA2 est également muté sporadiquement en association étroite avec les mutations bialléliques du gène CEBPA. GATA2 rejoint ainsi deux autres facteurs de transcription critiques de la différenciation hématopoïétique, RUNX1 et CEBPA, qui se retrouvent également mutés dans des LAM et MDS familiales et sporadiques.

■ **Mots clés** : GATA2, transcription, hématopoïèse, oncogénèse

Abstract

Recently, several groups including ours have identified frequent germline mutations of GATA2 in familial myelodysplasia (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). Germline mutations of GATA2 are also found in NK cells, monocytes and neutrophils deficits and lymphedema (Emberger syndrome) evolving frequently to MDS and AML. GATA2 is also mutated sporadically in close association with CEBPA bi-allelic mutations. GATA2 joins two other transcription factors critical for hematopoietic differentiation, RUNX1 and CEBPA, which are also found mutated in familial and sporadic MDS and AML.

■ **Key words**: GATA2, transcription, hematopoiesis, oncogenesis

L' hématopoïèse normale est finement régulée par des facteurs extrinsèques (les facteurs de croissance hématopoïétiques) et intrinsèques (les facteurs de transcription), relais des facteurs de croissance, dont l'expression est tissu et temps dépendante comme PU.1, RUNX1, CEBPA et GATA2 [1]. La réponse appropriée permet le maintien d'un contingent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ayant une capacité d'autorenouvel-

lement et de différenciation en cellules progénitrices (CHP). Ces cellules s'engagent ensuite vers une lignée spécifique lymphoïde ou myéloïde avant de donner des éléments matures circulant dans le sang. Dans un certain nombre de cas, les cellules hématopoïétiques peuvent acquérir ou perdre des fonctionnalités suite à des mutations des gènes critiques à cette différenciation. Ces mutations vont entraîner une transformation de ces cellules

Pour citer cet article : Pasquet M, Bellanné-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Broccardo C, Bachelier F, Donadieu J, Delabesse É. GATA2, un nouvel oncogène des leucémies aiguës myéloblastiques sporadiques et familiales. *Hématologie* 2014 ; 20 : 153-160. doi : 10.1684/hma.2014.0951

comme dans les myélodysplasies (MDS) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Les MDS résultent d'une atteinte clonale de cellules souches hématopoïétiques conduisant à une hématopoïèse inefficace et évoluant dans certains cas en LAM. Les LAM sont caractérisées par un blocage de la différenciation cellulaire au cours de la maturation myéloïde avec une prolifération de ces cellules. Le plus souvent, les LAM sont sporadiques et les patients âgés. Récemment, plusieurs équipes ont identifié des mutations germinales du facteur de transcription GATA2 associées à des MDS et LAM familiales. GATA2 est également muté sporadiquement en association étroite avec les mutations bialléliques de CEBPA. GATA2 rejoint ainsi deux autres facteurs de transcription critiques de la différenciation hématopoïétique, RUNX1 et CEBPA, qui se retrouvent également mutés dans des LAM et MDS familiales et sporadiques (voir plus bas).

GATA2, facteur de transcription

GATA2 est un des six membres de la famille des facteurs de transcription GATA, caractérisés par la capacité à se lier à une région d'ADN de type (A/T)GATA(A/G). Chez l'homme, le gène GATA2 est localisé sur le chromosome 3q21. Il comporte six exons (dont le premier n'est pas codant) répartis sur 14 kb et code une protéine de 480 acides aminés. La protéine est caractérisée par la présence de deux domaines contigus à doigt de zinc. Le domaine proximal (ZnF1, acides aminés 295 à 319) participe à l'interaction protéique tandis que le domaine distal (ZnF2, acides aminés 349 à 373) se fixe sur l'ADN (figure 1). GATA2 possède également deux domaines de transactiva-

tion, un du côté N-terminal et un du côté C-terminal [2, 3]. La protéine GATA2 est soumise à de nombreuses régulations post-transcriptionnelles comme la phosphorylation [4-6], l'acétylation affectant de nombreuses lysines localisées au niveau des deux doigts de zinc [7], la sumoylation [8] et l'ubiquitylation [9]. Par exemple, l'interleukine 3 conduit à une phosphorylation de GATA2 via les MAP kinases [6].

GATA2, gène central de l'hématopoïèse

GATA2 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques, les fibroblastes, les cellules endothéliales musculaires, pulmonaires et embryonnaires cérébrales et hépatiques [10-15]. Plus précisément dans le tissu hématopoïétique, GATA2 est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs multipotents, les progéniteurs érythroïdes, les mégacaryocytes, les polynucléaires éosinophiles et les mastocytes [12, 16, 17]. L'expression de GATA2 diminue progressivement au cours de la différenciation érythrocytaire [18, 19], granulocytaire [11] et mégacaryocytaire [20]. GATA2 participe également à l'angiogenèse en activant l'expression de KDR/VEGFR2/FLK1 [21] et au développement endothélial lymphatique [22]. GATA2 régule la production des cellules souches hématopoïétiques comme l'ont démontré les modèles murins de recombinaison homologue. Les souris invalidées pour *Gata2* (*Gata2*^{-/-}) meurent après dix à onze jours de gestation et les cellules souches hématopoïétiques issues de ces animaux présentent des défauts d'auto-renouvellement et de prolifération [16, 17, 23]. L'haploinsuffisance de *Gata2* (*Gata2*^{+/-}) conduit à une homéostasie anormale

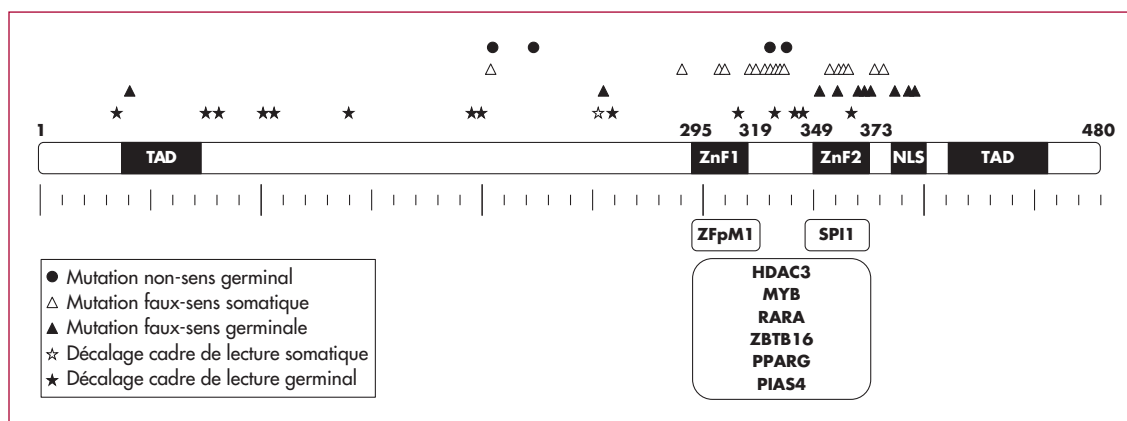


Figure 1. Localisation des mutations de GATA2 par rapport aux principaux domaines de la protéine de 480 acides aminés (TAD : domaine de transactivation; ZnF1, premier doigt de zinc; ZnF2, second doigt de zinc). Les mutations non-sens germinales, faux sens somatiques et germinales ainsi que les décalages du cadre de lecture somatiques et germinales sont indiqués (les délétions, partielles ou totales, ne sont pas indiquées). Les mutations germinales sont indiquées en noir et celles somatiques en blanc. Les régions d'association des partenaires protéiques au niveau des doigts de zinc sont indiquées.

des cellules souches hématopoïétiques, en particulier une diminution des précurseurs de la lignée granulomacrophagique [23, 24].

La transcription de *GATA2* est régulée par de nombreux facteurs de transcription comme ETS1 [25], BMP4 [26], NOTCH1 [27, 28], SPI1/PU.1 [29] et MECOM/EVI1 [30]. *GATA2* participe lui-même à une boucle d'auto-contrôle positif en compétition avec *GATA1* qui réprime lui la transcription de *GATA2* (*GATA switch*, voir plus bas) [31]. Cette transcription est réalisée à partir de deux promoteurs. L'un est distal et spécifique des tissus hématopoïétique et cérébral. Le second est proximal avec un profil élargi d'expression à tous les tissus exprimant *GATA2* [32, 33]. Deux éléments critiques de régulation de l'expression de *Gata2* ont été identifiés chez la souris à 1,8 kb en amont du site d'initiation de la transcription (-1,8 kb) participant à sa régulation au cours de l'érythropoïèse [34] et à -2,8 kb participant à sa régulation au niveau de la cellule souche hématopoïétique [35]. Trois autres régions régulatrices ont été également identifiées en -77 kb, -3,9 kb et +9,5 kb [36, 37].

Complexes protéiques de GATA2

La fonction de *GATA2* au niveau des cellules souches hématopoïétiques est régulée par son interaction avec FLI1 et TAL1 [38]. En particulier, ces trois protéines contrôlent en particulier l'expression de *RUNX1* [39] et *GATA2* active l'expression de *TAL1* en association avec FLI1 et ELF1 [40]. Les doigts de zinc de *GATA2* jouent un rôle essentiel dans les associations protéiques. Le domaine N-terminal interagit avec ZFPM1/FOG1 [41], le domaine C-terminal permet l'association avec SPI1/PU.1 [42] et les deux domaines sont nécessaires à l'interaction avec HDAC3 [43], MYB [44], RARA [45], ZBTB16/PLZF [46], PPARG [47] et PIAS4/PIASY [8]. La région adjacente au domaine C-terminal participe également à l'association avec *CEBPA* [3] (figure 1).

Différenciation et transition GATA2/GATA1 (*GATA switch*)

Les expressions de *GATA2* et de *GATA1* sont séquentielles durant les phases précoces et tardives de la différenciation hématopoïétique, ces deux facteurs de transcription se fixent aux mêmes régions d'ADN [48, 49] avec des propriétés antagonistes (répression ou activation de la transcription) [50]. L'expression de *GATA2* s'effondre drastiquement lors du relais pris par *GATA1* au cours de la différenciation érythroïde, diminuant de plus de 100 fois en 3 h et disparaissant totalement après 24 h [19]. L'absence d'expression de *GATA2* permet quand même une différenciation myéloïde et érythroïde terminale tandis

que l'absence de *GATA1* conduit à un blocage de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire [17]. Le maintien de l'expression de *GATA2* aboutit à un blocage de la différenciation hématopoïétique [51]. Une régulation négative de l'expression de *GATA2* par *GATA1* est nécessaire à la poursuite de la différenciation érythroïde en induisant l'expression de gènes critiques de cette différenciation terminale tout en bloquant la prolifération de ces cellules [19, 52]. La transition de fonction entre *GATA2* et *GATA1* au cours de la différenciation érythroïde est liée également à la différence de stabilité des deux protéines, *GATA1* étant plus stable que *GATA2* [53].

MDS et LAM familiales

Les MDS et les LAM familiales sont rares [54]. *GATA2* est le troisième gène impliqué dans la survenue de ces hémopathies après *RUNX1* et *CEBPA*.

Des mutations germinales hétérozygotes de *RUNX1* avec une transmission autosomique dominante ont été identifiées. La présentation clinique se caractérise par une atteinte plaquettaire (thrombopénie et thrombopathie fonctionnelle conduisant à des saignements) et le développement de MDS et LAM dans un tiers des patients ayant ces mutations *RUNX1* [55]. Celles-ci se situent principalement dans le domaine de liaison à l'ADN (Runt Homology Domain, RHD) conduisant à une absence de fixation à l'ADN de la protéine mutée [56]. Des mutations acquises de *RUNX1* sur le second allèle surviennent lors de l'évolution en LAM [57]. Des mutations somatiques de *RUNX1* sans mutation germinale ont également été identifiées dans MDS et LAM, en particulier de type M0 et en association avec la trisomie 13 [58].

Le gène *CEBPA* (CCAAT enhancer binding protein α) est muté dans des LAM familiales caractérisées par une transmission autosomique dominante et une pénétrance élevée [59]. Ces mutations germinales se retrouvent localisées dans le domaine N-terminal de *CEBPA*. Lors de l'évolution en LAM chez ces patients, une seconde mutation acquise de *CEBPA* survient dans la région C-terminal [54]. Les mutations de *CEBPA* se retrouvent également dans les LAM sporadiques (6 à 15% des LAM selon les études). Les mutations sont soit mono-alléliques, soit bialléliques combinant une mutation N-terminale sur un allèle et C-terminale sur le second allèle. Ces mutations sont associées à un pronostic favorable, en particulier quand elles sont bi-alléliques [60-62].

Mutations germinales de GATA2

Des mutations germinales de *GATA2* (délétions partielles ou totales, mutations ponctuelles non-sens ou faux sens,

décalage du cadre de lecture) ont été décrites récemment associées à des présentations cliniques variées : vasculaire, surdité, déficit immunitaire ou leucémique. Ces manifestations peuvent être présentes chez un même malade successivement. L'histoire clinique peut montrer la prédominance d'un aspect ou d'un autre, mais associe souvent en premier lieu une neutropénie modérée, une monocytopenie et un déficit en cellules NK. Dans un second temps, apparaissent des infections virales en particulier à papillomavirus et des infections à mycobactéries atypiques. Enfin, la maladie évolue en hémopathie maligne. Les mutations de *GATA2* sont concentrées sur le second doigt de zinc (mutations faux sens localisées sur ce doigt de zinc ou mutations non-sens en amont de ce domaine). Dans certains cas, des délétions partielles (en particulier de la région de régulation de type *enhancer* localisée dans l'intron 4 de *GATA2* [63]) ou totales [64] sont retrouvées. Sur le plan moléculaire, de nombreuses mutations différentes ont été décrites, sans corrélation phénotype/génotype, notamment au sein d'une même famille. La variété des mutations (mutations faux sens et non-sens, délétions totales, délétion de l'*enhancer* de l'intron 4) suggère préférentiellement un mécanisme d'haploinsuffisance même si un mécanisme de dominance négative ne peut être exclu pour certaines mutations cliniques (*tableau 1* et *figure 1*). Des mutations de *GATA2* ont été identifiées dans le syndrome d'Emberger, suggérant un lien entre l'atteinte vasculaire et les mutations de *GATA2*. La publication initiale

rapportait dans une famille de la région de Montpellier l'association d'un lymphoedème primitif, d'une surdité de perception et d'une prédisposition au développement de LAM [65]. Le lymphoedème peut être uni- ou bilatéral et survenir à tout âge, avant ou après l'apparition d'une hémopathie, voire après transplantation médullaire. Parmi les patients porteurs de mutations de *GATA2*, environ 10% ont cette présentation. *GATA2* est fortement exprimé au niveau des vaisseaux lymphatiques, en particulier du système valvulaire lymphatique [66]. Plus rarement, les vaisseaux sanguins peuvent être atteints conduisant à des dissections aortiques et des infarctus précoces.

Le déficit immunitaire primitif, appelé MonoMAC [67], combine des déficits en cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B et Natural Killer (NK) [67-69]. Une neutropénie modérée est fréquemment associée [64]. Ce déficit immunitaire est caractérisé par une susceptibilité aux infections comme les mycobactéries atypiques (typiquement le complexe *Mycobacterium Avium*), les virus herpétiques, la grippe et les papillomavirus. Ce déficit se révèle avant tout dans la seconde et troisième décennie de vie. La mise en évidence de ce déficit immunitaire demeure délicate, car le phénotype des lymphocytes, les tests fonctionnels lymphocytaires et le dosage pondéral des immunoglobulines sont généralement normaux ou montrent une discrète hypogammaglobulinémie.

Finalement, les anomalies les plus fréquentes sont une neutropénie modérée, une monocytopenie et une lym-

Tableau 1. Mutations publiées de *GATA2*, germinales et somatiques, en fonction de leur localisation protéique (avant le premier doigt de zinc [Pré-ZnF], au niveau du premier doigt de zinc [ZnF1], entre les 2 doigts de zinc [Inter-ZnF], au niveau du second doigt de zinc [ZnF2] et après les second doigt de zinc [Post-ZnF]) montrant la répartition différente entre les mutations germinales et celles acquises. Les mutations de l'*enhancer* de l'intron 4 ainsi que les délétions totales ou partielles du locus *GATA2* sont indiquées.

Localisation mutation <i>GATA2</i>	Total	Germinale	Somatique	Non Sens	Faux sens	Décalage cadre de lecture	Autre/Non précisé	CEBPA double muté
Pré-ZnF (aa1-259)	22	20	2	2	3	17	0	0
ZnF1 (aa293-321)	45	1	44	0	44	1	0	42
Inter-ZnF (aa328-342)	17	9	8	6	7	3	1	6
ZnF2 (aa354-373)	55	41	14	0	49	1	6	6
Post-ZnF (aa379-398)	26	24	2	0	26	0	0	1
Enhancer	11	11					11	
Délétion (totale ou partielle)	9	9					9	
Non précisé	1	1						
<i>Total</i>	186	116	70	8	129	22	27	

phopénie NK [64]. Du fait de sa facilité à être détectée sur un simple hémogramme et avant tout autre complication, la neutropénie chronique apparaît très tôt dans la vie et peut conduire à un diagnostic précoce, avant l'apparition de manifestations infectieuses ou d'une hémopathie maligne [64].

L'évolution de ces patients est marquée par un risque majeur de transformation clonale myéloïde sous forme de MDS ou de LAM. Ces hémopathies présentent très fréquemment une monosomie 7 acquise. Le risque cumulé de transformation maligne est l'un des plus élevés parmi les syndromes de susceptibilité génétique aux leucémies : 54% à 20 ans et 63% à 30 ans [64]. En plus des proliférations clonales, des tumeurs solides sont observées conséquences des infections à papillomavirus (carcinomes vulvaires) ou à virus d'Epstein-Barr (lymphome non Hodgkinien) [70].

Enfin, il peut être noté des malformations de l'appareil urogénital, un retard intellectuel et une protéinose alvéolaire, cette dernière probablement liée à un défaut de phagocytose des macrophages.

La description de l'entité GATA2 est nouvelle et il ne peut exister actuellement de données établies à partir de la littérature sur la prise en charge de ces patients qui cumulent deux menaces vitales que sont le déficit immunitaire et la leucémie. L'allogreffe de moelle osseuse apparaît indiquée, y compris avec donneur non apparenté ou unité de sang placentaire, comme cela a été proposé par de nombreuses équipes [64, 71]. Cuellar-Rodriguez *et al.* rapportent ainsi une série de six patients greffés avec un conditionnement non myéloablatif dont cinq patients sont en vie avec un suivi médian de dix-sept mois, une bonne reconstitution immunologique à un an, un haut niveau de prise de greffe sur le plan hématologique, et l'absence de toxicité importante [71].

Mutations somatiques de GATA2

À l'instar de *RUNX1* et de *CEBPA*, des mutations somatiques de GATA2 ont été également identifiées soit dans des phases blastiques de leucémie myéloïde chronique (LMC), soit dans des LAM.

La transformation blastique de la LMC représentait une évolution naturelle de la LMC. Depuis la prise en charge de cette maladie par les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (imatinib, nilotinib, dasatinib, ponatinib), ces évolutions sont devenues exceptionnelles. Des mutations de GATA2 ont été retrouvées de manière récurrente dans des cas de crise blastique de leucémie myéloïde chronique chez neuf patients sur quatre-vingt-cinq LMC en phase avancée ou en crise blastique, huit présentant la même mutation L359V ayant une fonction de type gain de fonction et un ayant une délétion des codons 341 à 346 [72].

Des mutations acquises de GATA2 ont été détectées dans des LAM, en association spécifique avec des mutations bialléliques de *CEBPA*. Greif *et al.* ont identifié des mutations de GATA2 localisées sur le premier doigt de zinc (L321V et R330Q) [73]. D'autres mutations de GATA2 (localisées sur les acides aminés R293, N317, A318, G320, L321, Q328 et R330) ont été ensuite retrouvées chez treize patients sur trente-trois présentant une mutation bi-allélique de *CEBPA* (39%). Aucune mutation de GATA2 n'a été identifiée dans cette étude chez les patients porteurs de mutation mono-allélique de *CEBPA* [73]. Cette association entre mutations bialléliques de *CEBPA* et celle de GATA2 a été confirmée par plusieurs études dans des proportions similaires de 27% (15/55) [74] et de 18,3% (18/98) [75]. Il est à noter que dans une famille présentant une mutation germinale de *CEBPA*, une mutation secondaire de GATA2 survint chez trois de ces membres [74].

En dehors de ces LAM présentant une mutation de *CEBPA*, les mutations de GATA2 sont très rares dans les LAM [75-80]. L'étude de Yan *et al.* portant sur les mécanismes moléculaires des LAM de type M5 identifia trois mutations de GATA2 sur 112 patients [76]. Dans une étude portant sur 261 LAM de l'enfant, 5 patients présentaient une mutation de GATA2 (4 du codon R362 localisé sur le second doigt de zinc et une du codon A318 sur le premier doigt de zinc) dont deux associées à une mutation de *CEBPA* et quatre à une mutation de *NRAS* [79]. Fasan *et al.* ont montré que ces mutations de GATA2 pouvaient disparaître à la rechute suggérant que ces mutations sont des événements secondaires au cours du processus oncogénique [75].

Les mutations acquises de GATA2 se distinguent de celles germinales par une prépondérance des mutations ponctuelles localisées quasi-exclusivement sur les deux doigts de zinc sans mutation non-sens, ni décalage du cadre de lecture (à une exception [74], *figure 1* et *tableau 1*).

Surexpression de GATA2 dans les LAM de mauvais pronostic

Deux études se sont intéressées au niveau d'expression de GATA2 dans les LAM. Une série pédiatrique de 237 LAM de l'enfant a démontré que le niveau élevé d'expression de GATA2 au diagnostic était associé à une survie globale plus défavorable [79]. De même, une étude similaire portant sur 259 LAM de l'adulte a montré une association pronostique similaire [81].

Fonction des mutations de GATA2

Actuellement, peu d'éléments fonctionnels permettent de comprendre le lien entre la mutation de GATA2, la

variabilité du phénotype hématologique et immunologique et le délai d'apparition parfois tardif du déficit immunitaire. Deux papiers récents ont mis en évidence un défaut d'hématopoïèse précoce fœtale et adulte chez la souris présentant une inactivation conditionnelle d'un enhancer par délétion hétérozygote d'un site de liaison à l'ADN [22, 82]. L'hypothèse actuelle serait une attrition progressive du réservoir de cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs débutant dès l'embryogénèse et se poursuivant pendant l'enfance et la période adulte jeune. Mace *et al.* rapporte le rôle majeur de GATA2 dans la maturation des cellules NK, et spécifiquement dans le maintien du pool CD56 bright [83]. GATA2 est également essentiel au développement vasculaire lymphatique endothélial, conduisant chez la souris à un décès précoce (E16.5) des embryons par œdème et hémorragie après modélisation de la délétion de l'enhancer +9,5 kb retrouvée chez un patient MonoMAC [22, 82].

Conflits d'intérêt : Aucun.

Références

- Wilson NK, Foster SD, Wang X, *et al.* Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 2010 ; 7 : 532-44.
- Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, *et al.* Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* 2003 ; 102 : 896-905.
- Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2005 ; 25 : 706-15.
- Koga S, Yamaguchi N, Abe T, *et al.* Cell-cycle-dependent oscillation of GATA2 expression in hematopoietic cells. *Blood* 2007 ; 109 : 4200-8.
- Menghini R, Marchetti V, Cardellini M, *et al.* Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation* 2005 ; 111 : 1946-53.
- Towatari M, May GE, Marais R, *et al.* Regulation of GATA-2 phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and interleukin-3. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 4101-7.
- Hayakawa F, Towatari M, Ozawa Y, Tomita A, Privalsky ML, Saito H. Functional regulation of GATA-2 by acetylation. *J Leukoc Biol* 2004 ; 75 : 529-40.
- Chun TH, Itoh H, Subramanian L, Iniguez-Lluhi JA, Nakao K. Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. *Circulation research* 2003 ; 92 : 1201-8.
- Minegishi N, Suzuki N, Kawatani Y, Shimizu R, Yamamoto M. Rapid turnover of GATA-2 via ubiquitin-proteasome protein degradation pathway. *Genes Cells* 2005 ; 10 : 693-704.
- Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 1279-85.
- Labbaye C, Valtieri M, Barberi T, *et al.* Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest* 1995 ; 95 : 2346-58.
- Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, *et al.* The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* 1999 ; 93 : 4196-207.
- Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY, Orkin SH. Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 1999 ; 210 : 305-21.
- Connelly JJ, Wang T, Cox JE, *et al.* GATA2 is associated with familial early-onset coronary artery disease. *PLoS Genet* 2006 ; 2 : e139.
- Kumar MS, Hancock DC, Molina-Arcas M, *et al.* The GATA2 transcriptional network is requisite for RAS oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Cell* 2012 ; 149 : 642-55.
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, *et al.* An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994 ; 371 : 221-6.
- Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997 ; 89 : 3636-43.
- Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* 1993 ; 82 : 1071-9.
- Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, *et al.* Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood* 2004 ; 104 : 3136-47.
- Martin DI, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 1990 ; 344 : 444-7.
- Mammoto A, Connor KM, Mammoto T, *et al.* A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature* 2009 ; 457 : 1103-8.
- Lim KC, Hosoya T, Brandt W, *et al.* Conditional Gata2 inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 3705-17.
- Ling KW, Ottersbach K, Van Hamburg JP, *et al.* GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2004 ; 200 : 871-82.
- Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, *et al.* Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 2005 ; 106 : 477-84.
- Lulli V, Romania P, Morsilli O, *et al.* Overexpression of Ets-1 in human hematopoietic progenitor cells blocks erythroid and promotes megakaryocytic differentiation. *Cell Death Differ* 2006 ; 13 : 1064-74.
- Maeno M, Mead PE, Kelley C, *et al.* The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood* 1996 ; 88 : 1965-72.
- Kumano K, Chiba S, Shimizu K, *et al.* Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood* 2001 ; 98 : 3283-9.
- Robert-Moreno A, Espinosa L, De La Pompa JL, Bigas A. RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development* 2005 ; 132 : 1117-26.
- Walsh JC, Dekoter RP, Lee HJ, *et al.* Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* 2002 ; 17 : 665-76.
- Yuasa H, Oike Y, Iwama A, *et al.* Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *EMBO J* 2005 ; 24 : 1976-87.
- Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ; 100 : 8811-6.
- Minegishi N, Ohta J, Suwabe N, *et al.* Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 3625-34.
- Pan X, Minegishi N, Harigae H, *et al.* Identification of human GATA-2 gene distal 5' exon and its expression in hematopoietic stem cell fractions. *J Biochem* 2000 ; 127 : 105-12.

34. Snow JW, Trowbridge JJ, Fujiwara T, et al. A single cis element maintains repression of the key developmental regulator Gata2. *PLoS Genet* 2010;6.
35. Snow JW, Trowbridge JJ, Johnson KD, et al. Context-dependent function of "GATA switch" sites in vivo. *Blood* 2011 ; 117 : 4769-72.
36. Grass JA, Jing H, Kim SI, et al. Distinct functions of dispersed GATA factor complexes at an endogenous gene locus. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 : 7056-67.
37. Khandekar M, Brandt W, Zhou Y, et al. A Gata2 intronic enhancer confers its pan-endothelia-specific regulation. *Development* 2007 ; 134 : 1703-12.
38. Pimanda JE, Ottersbach K, Knezevic K, et al. Gata2, Flt1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 : 17692-7.
39. Nottingham WT, Jarratt A, Burgess M, et al. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood* 2007 ; 110 : 4188-97.
40. Gottgens B, Nastos A, Kinston S, et al. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J* 2002 ; 21 : 3039-50.
41. Chang AN, Cantor AB, Fujiwara Y, et al. GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 9237-42.
42. Zhang P, Behre G, Pan J, et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ; 96 : 8705-10.
43. Ozawa Y, Towatari M, Tsuzuki S, et al. Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. *Blood* 2001 ; 98 : 2116-23.
44. Kitajima K, Masuhara M, Era T, Enver T, Nakano T. GATA-2 and GATA-2/ER display opposing activities in the development and differentiation of blood progenitors. *EMBO J* 2002 ; 21 : 3060-9.
45. Tsuzuki S, Kitajima K, Nakano T, Glasow A, Zelent A, Enver T. Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 6824-36.
46. Tsuzuki S, Enver T. Interactions of GATA-2 with the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, its homologue FAZF, and the t(11;17)-generated PLZF-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Blood* 2002 ; 99 : 3404-10.
47. Tong Q, Dalglin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 2000 ; 290 : 134-8.
48. Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 4011-22.
49. Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 3999-4010.
50. Doré LC, Chlon TM, Brown CD, White KP, Crispino JD. Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide GATA factor switching during hematopoiesis. *Blood* 2012 ; 119 : 3724-33.
51. Persons DA, Allay JA, Allay ER, et al. Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* 1999 ; 93 : 488-99.
52. Muntean AG, Crispino JD. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood* 2005 ; 106 : 1223-31.
53. Lurie LJ, Boyer ME, Grass JA, Bresnick EH. Differential GATA factor stabilities: implications for chromatin occupancy by structurally similar transcription factors. *Biochemistry* 2008 ; 47 : 859-69.
54. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia—a review. *British journal of haematology* 2008 ; 140 : 123-32.
55. Downton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood* 1985 ; 65 : 557-63.
56. Jongmans MC, Kuiper RP, Carmichael CL, et al. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia* 2010 ; 24 : 242-6.
57. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 2009 ; 113 : 5583-7.
58. Schnittger S, Dicker F, Kern W, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* 2011 ; 117 : 2348-57.
59. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2403-7.
60. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 2010 ; 28 : 2739-47.
61. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 2010 ; 28 : 570-7.
62. Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, et al. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2009 ; 113 : 6558-66.
63. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* 2013 ; 121 : 3830-7.
64. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavtavian S, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* 2013 ; 121 : 822-9.
65. Emberger JM, Navarro M, Dejean M, Izarn P. [Deaf-mutism, lymphedema of the lower limbs and hematological abnormalities (acute leukemia, cytopenia) with autosomal dominant transmission]. *Journal de genétique humaine* 1979 ; 27 : 237-45.
66. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood* 2012 ; 119 : 1283-91.
67. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* 2011 ; 118 : 2653-5.
68. Vinh DC, Patel SY, Uzel G, et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 2010 ; 115 : 1519-29.
69. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* 2011 ; 118 : 2656-8.
70. Mutsaers PG, Van De Loosdrecht AA, Tawana K, Bodor C, Fitzgibbon J, Menko FH. Highly variable clinical manifestations in a large family with a novel GATA2 mutation. *Leukemia* 2013.
71. Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, Freeman AF, et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Blood* 2011 ; 118 : 3715-20.
72. Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 2076-81.
73. Greif PA, Dufour A, Konstandin NP, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2012 ; 120 : 395-403.

- 74.** Green CL, Tawana K, Hills RK, *et al.* GATA2 mutations in sporadic and familial acute myeloid leukaemia patients with CEBPA mutations. *Br J Haematol* 2013.
- 75.** Fasan A, Eder C, Haferlach C, *et al.* GATA2 mutations are frequent in intermediate-risk karyotype AML with biallelic CEBPA mutations and are associated with favorable prognosis. *Leukemia* 2013 ; 27 : 482-5.
- 76.** Yan XJ, Xu J, Gu ZH, *et al.* Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 309-15.
- 77.** Zhang SJ, Shi JY, Li JY. GATA-2 L359 V mutation is exclusively associated with CML progression but not other hematological malignancies and GATA-2 P250A is a novel single nucleotide polymorphism. *Leuk Res* 2009 ; 33 : 1141-3.
- 78.** Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, *et al.* Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011 ; 43 : 1012-7.
- 79.** Luesink M, Hollink IH, Van Der Velden VH, *et al.* High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2012 ; 120 : 2064-75.
- 80.** Vicente C, Conchillo A, Garcia-Sanchez MA, Otero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012 ; 82 : 1-17.
- 81.** Vicente C, Vazquez I, Conchillo A, *et al.* Overexpression of GATA2 predicts an adverse prognosis for patients with acute myeloid leukemia and it is associated with distinct molecular abnormalities. *Leukemia* 2012 ; 26 : 550-4.
- 82.** Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, *et al.* Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 3692-704.
- 83.** Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, *et al.* Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56bright subset. *Blood* 2013 ; 121 : 2669-77.

GATA2 : un nouveau gène des myélo-dysplasies et des leucémies aiguës myéloblastiques familiales

GATA2: a new gene in familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia

M. Pasquet^{1, 2}, É. Delabesse^{2, 3}

RÉSUMÉ

SUMMARY

» Récemment, plusieurs équipes ont identifié des mutations germinales du facteur de transcription GATA2 associées à des syndromes myélodysplasiques (SMD) et à des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) familiales. Les mutations germinales de GATA2 sont également associées à des déficits en cellules NK (Natural Killer), monocytes et à des prédispositions aux infections mycobactériennes (syndrome MonoMAC), à des neutropénies chroniques et à des lymphœdèmes (syndrome d'Emberger). Ces atteintes évoluent fréquemment en SMD et en LAM. Compte tenu de la gravité des hémopathies myéloïdes et du déficit immunitaire, la prise en charge actuelle de ces patients repose essentiellement sur l'allogreffe de moelle osseuse. GATA2 rejoint ainsi 2 autres facteurs de transcription critiques de la différenciation hématopoïétique – RUNX1 et CEBPA – qui se retrouvent également mutés dans les SMD et les LAM familiales.

Recently, several groups have identified germline mutations of GATA2 in familial myelodysplasia (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). Germline mutations of GATA2 are also found in NK cells, monocytes deficits associated with mycobacterial infections (MonoMAC syndrome), in neutrophils deficits and lymphedema (Emberger syndrome). These phenotypes evolve frequently to MDS and AML. Due to lethal nature of GATA2 deficiency with AML/MDS or immune deficiency, allogeneic bone marrow transplantation remains the therapeutic of choice. GATA2 joins two other transcription factors critical for hematopoietic differentiation – RUNX1 and CEBPA – which are also found mutated in familial MDS and AML.

Mots-clés : GATA2 – Leucémie aiguë myéloïde – Myélodysplasie – Hémopathie familiale – Neutropénie.

Keywords: GATA2 – Acute myeloid leukemia – Myelodysplasia – Familial hematologic disorder – Neutropenia.

L'étude des formes familiales et des syndromes de prédisposition aux hémopathies permet d'identifier et de mieux comprendre le rôle des gènes impliqués dans l'hématopoïèse normale et pathologique. L'hématopoïèse normale est finement régulée par des facteurs extrinsèques (les facteurs de croissance hématopoïétiques) et des facteurs intrinsèques (les facteurs de transcription), relais des facteurs de croissance, dont l'expression est tissu- et temps-dépendante, comme PU.1, RUNX1, CEBPA et GATA2 (1). Dans un certain nombre de cas, les cellules hématopoïétiques peuvent acquérir ou perdre des fonctionnalités à la suite des mutations des gènes critiques à cette différenciation. Ces mutations vont entraîner une transformation de ces cellules comme dans les myélo-

dysplasies (SMD) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). La fréquence de ces maladies augmente avec l'âge (âge moyen : 65 ans) et elles sont le plus souvent sporadiques. Néanmoins, il existe des formes familiales plus rares caractérisées par un âge plus jeune au diagnostic et l'atteinte d'au moins un parent au premier degré. Parmi les prédispositions aux SMD et aux LAM associés à des mutations des facteurs de transcription, les mutations du gène GATA2 ont été récemment identifiées par plusieurs équipes, associées à des SMD et des LAM familiales et à une cohorte de symptômes cliniques (hématologiques, immunologiques, malformatifs, vasculaires, etc.). Ces mutations viennent donc rejoindre celles des facteurs de transcription RUNX1 et CEBPA, associées à des désordres plaquettaires et au dévelop-

¹ Service d'oncologie pédiatrique, CHU de Purpan, Toulouse.

² Inserm U1037, Centre de recherche sur le cancer, Toulouse.

³ Laboratoire d'hématologie, CHU de Purpan, et université Toulouse III – Paul Sabatier, Toulouse.

pement d'hémopathies familiales. La reconnaissance de ces formes familiales rares est primordiale, sur les plans à la fois clinique et thérapeutique, pour adapter la prise en charge des patients, pour le dépistage chez les apparentés et pour proposer un conseil génétique à plus long terme. Sur le plan biologique, ce dépistage permet une plus large compréhension des mécanismes impliqués dans la leucémogénèse.

Rôle de GATA2 dans l'hématopoïèse normale et pathologique

GATA2 est un membre de la famille des facteurs de transcription GATA, caractérisés par leur capacité à se lier à une région d'ADN de type (A/T)GATA(A/G). La protéine GATA2 est caractérisée par la présence de 2 domaines contigus à doigt de zinc. Le domaine proximal participe à l'interaction protéique tandis que le domaine distal se fixe sur l'ADN. GATA2 possède également 2 domaines de transactivation (*figure*). GATA2 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques (cellules souches hématopoïétiques [CSH], progéniteurs multipotents, progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytes, polynucléaires éosinophiles et mastocytes), les fibroblastes, les cellules endothéliales musculaires, pulmonaires et embryonnaires cérébrales et hépatiques. L'expression de GATA2 diminue progressivement au cours de la différenciation érythrocytaire. GATA2 régule la production des CSH; les souris invalidées pour *Gata2* (*Gata2*^{-/-}) meurent après 10 à 11 jours de gestation et les CSH issues de ces animaux présentent des défauts d'autorenouvellement et de prolifération (2). L'haplo-insuffisance de *Gata2*

(*Gata2*^{+/-}) conduit à une homéostasie anormale des CSH, en particulier à une diminution des précurseurs de la lignée granulo-macrophagique (3, 4).

GATA2 est transcrit à partir de 2 promoteurs via de nombreux facteurs de transcription comme ETS1, BMP4, NOTCH1, SPI1/PU.1 et MECOM/EVI1. GATA2 participe lui-même à une boucle d'autocontrôle positif en compétition avec GATA1 qui réprime la transcription de GATA2 ("GATA switch"). Les expressions de GATA2 et de GATA1 sont séquentielles durant les phases précoces et tardives de la différenciation hématopoïétique; ces 2 facteurs de transcription se fixent aux mêmes régions d'ADN avec des propriétés antagonistes (répression ou activation de la transcription) [5]. L'absence d'expression de GATA2 permet néanmoins une différenciation myéloïde et érythroïde terminale tandis que l'absence de GATA1 conduit à un blocage de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (6). Le maintien de l'expression de GATA2 aboutit à un blocage de la différenciation hématopoïétique. Une régulation négative de l'expression de GATA2 par GATA1 est nécessaire à la poursuite de la différenciation érythroïde en induisant l'expression de gènes critiques de cette différenciation terminale tout en bloquant la prolifération de ces cellules (7).

Phénotypes cliniques associés aux mutations de GATA2

Des mutations germinales de GATA2 (délétions partielles ou totales, mutations ponctuelles non-sens ou faux-sens, décalage du cadre de lecture) ont été récemment décrites, associées à des hémopathies

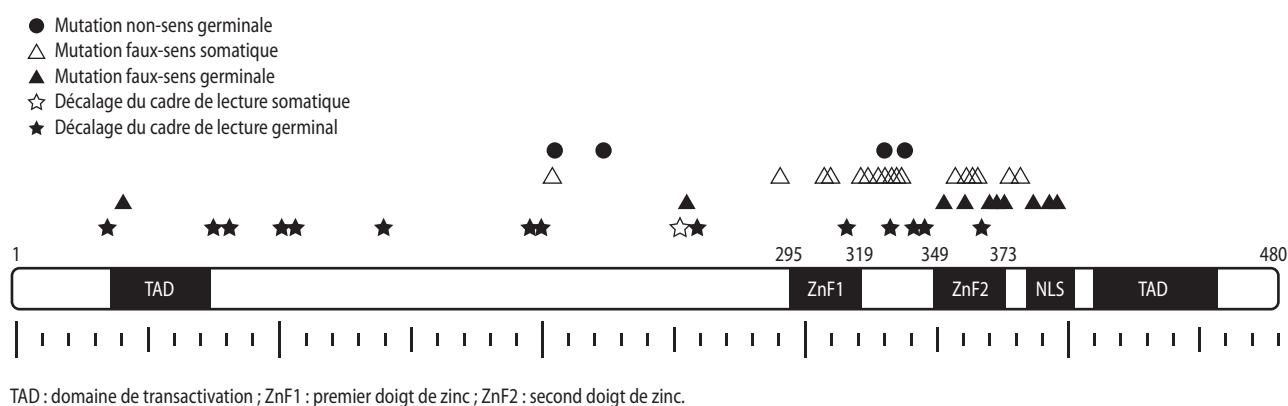


Figure. Localisation des mutations de GATA2 par rapport aux principaux domaines de la protéine de 480 acides aminés.

Les mutations non-sens germinales, faux-sens somatiques et germinales ainsi que les décalages du cadre de lecture somatique et germinale sont indiqués (les délétions, partielles ou totales, ne le sont pas). Les mutations germinales sont indiquées en noir et les somatiques en blanc.

myéloïdes et à des présentations cliniques variées : vasculaire, surdité, protéinose alvéolaire, déficit immunitaire. Ces manifestations peuvent être présentes chez un même malade, de façon successive. L'histoire clinique peut montrer la prédominance d'un aspect ou d'un autre, mais associe souvent, sur le plan immunologique, une neutropénie modérée, une monocytopenie et un déficit en cellules NK (*Natural Killer*). Sur le plan clinique, on retrouve chez une partie des patients des infections virales en particulier à papillomavirus et aux virus du groupe Herpès, des infections à mycobactéries atypiques et des infections fongiques invasives. Parallèlement ou dans un deuxième temps, la maladie évolue en une hémopathie maligne myéloïde. Le **tableau** présente les différents paramètres d'anamnèse, cliniques, biologiques et d'évolution permettant d'orienter les cliniciens dans le dépistage des patients présentant un tableau évocateur de ces pathologies.

Les mutations de *GATA2* sont concentrées sur le second doigt de zinc (mutations faux-sens localisées sur ce doigt de zinc ou mutations non-sens en amont de ce

domaine). Dans certains cas, des délétions partielles (en particulier de la région de régulation de type *enhancer* localisée dans l'intron 4 de *GATA2*) [8] ou totales (9) sont retrouvées. Sur le plan moléculaire, de nombreuses mutations différentes ont été décrites, sans corrélation phénotype/génotype, notamment au sein d'une même famille.

Syndrome d'Emberger et atteintes vasculaires

Des mutations de *GATA2* ont été identifiées dans le syndrome d'Emberger, ce qui suggère un lien entre l'atteinte vasculaire lymphatique et les mutations de *GATA2*. La publication initiale rapportait, au sein d'une famille de la région de Montpellier, l'association d'un lymphœdème primitif, d'une surdité de perception et d'une prédisposition au développement de LAM (10). Le lymphœdème peut être uni- ou bilatéral et survenir à tout âge, avant ou après l'apparition d'une hémopathie, voire après une transplantation médullaire. Parmi les patients porteurs de mutations de *GATA2*, environ 10 % ont cette présentation. *GATA2* est fortement exprimé au niveau des vaisseaux lymphatiques,

Tableau. Éléments clinico-biologiques devant faire suspecter une mutation germinale de *GATA2* dans les LAM et les SMD familiaux.

Histoire personnelle/familiale	Histoire familiale de LAM et/ou de SMD Infections répétées à HPV, virus Herpès, mycobactéries atypiques, fongiques Verrues Surdité Lymphœdème Atteintes vasculaires (dissections, infarctus du myocarde)
Signes cliniques	Signes d'insuffisance médullaire Infections à mycobactéries atypiques, HPV, virus Herpès et grippe Verrues Lymphœdème Surdité Protéinose alvéolaire Autres (plus rares) : malformations urogénitales, retard intellectuel, défaut de réponse immune (carcinome HPV induit, lymphome EBV induit)
Signes biologiques	Sur la numération - Neutropénie chronique modérée - Macrocytose - Monocytopenie Sur l'analyse médullaire - Myélodysplasie - Leucémie aiguë myéloblastique - Monosomie 7, trisomie 8 Sur l'analyse immunologique - Monocytopenie, neutropénie - Lymphopénie B - Lymphopénie NK - Fonctions lymphocytaires T normales - Hypogammaglobulinémie modérée ou dosage des immunoglobulines normal, sérologies vaccinales normales
Évolution	Décès précoce à la suite d'une hémopathie myéloïde Hémopathie réfractaire à la chimiothérapie

EBV : virus d'Epstein-Barr ; HPV : papillomavirus humain.

en particulier du système valvulaire lymphatique (11). Plus rarement, les vaisseaux sanguins peuvent être atteints, conduisant à des dissections aortiques et à des infarctus précoces.

Déficit immunitaire ou MonoMAC

Le déficit immunitaire primitif associé aux mutations de *GATA2* est appelé MonoMAC (12), et combine des déficits en cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B et NK (12-14). Une neutropénie modérée est fréquemment associée (9). Ce déficit immunitaire est caractérisé par une susceptibilité aux infections comme les mycobactéries atypiques (typiquement, le complexe *Mycobacterium avium*), les virus herpétiques, la grippe, les papillomavirus et, plus rarement, les champignons. Ce déficit se révèle avant tout dans la deuxième et la troisième décennie de vie. La mise en évidence de ce déficit immunitaire est délicate, car le phénotype des lymphocytes, les tests fonctionnels lymphocytaires et le dosage pondéral des immunoglobulines sont généralement normaux ou montrent une discrète hypogammaglobulinémie. Finalement, les anomalies les plus fréquentes sont une neutropénie modérée, une monocytopenie et un déficit en cellules NK. Du fait de leur facilité à être détectées sur un simple hémogramme et avant tout autre complication, la neutropénie chronique et la monocytopenie apparaissent tôt dans la vie et peuvent conduire à un diagnostic précoce, avant l'apparition de manifestations infectieuses ou d'une hémopathie maligne (9).

Hémopathies myéloblastiques et autres tumeurs

L'évolution des patients est marquée par un risque majeur de transformation clonale myéloïde sous la forme de SMD ou de LAM. Ces hémopathies présentent très fréquemment une monosomie 7 et/ou une trisomie 8 acquises. Le risque cumulé de transformation maligne est l'un des plus élevés parmi les syndromes de susceptibilité génétique aux leucémies : 54 % à 20 ans et 73 % à 30 ans (9). En plus des proliférations clonales, des tumeurs solides sont observées, conséquences des infections à papillomavirus (carcinomes vulvaires) ou à virus d'Epstein-Barr (lymphome non hodgkinien) [15].

Autres atteintes

Les mutations de *GATA2* sont parfois associées à des malformations de l'appareil urogénital, à un retard intellectuel et à une protéinose alvéolaire, cette dernière étant probablement liée à un défaut de phagocytose des macrophages.

Prise en charge thérapeutique des patients porteurs de mutations *GATA2*

La description de l'entité *GATA2* est nouvelle. Il n'existe donc pas, actuellement, de conférence de consensus clairement établie à partir de la littérature quant à la prise en charge de ces patients qui cumulent ces 2 menaces vitales que sont le déficit immunitaire et la leucémie. L'allogreffe de moelle osseuse paraît indiquée, y compris avec donneur non apparenté ou unité de sang placentaire, comme cela a été proposé par de nombreuses équipes (9, 16). J. Cuellar-Rodriguez et al. ont ainsi rapporté une série de 6 patients porteurs d'un déficit immunitaire avec complications infectieuses sévères, et greffés avec un conditionnement non myéloablatif. Cinq patients sont en vie avec un suivi médian de 17 mois, une bonne reconstitution immunologique à 1 an, un haut niveau de prise de greffe sur le plan hématologique, et l'absence de toxicité importante (16). Dans notre série comportant 14 patients et apparentés, le développement d'hémopathies myéloïdes survient dans 54 % des cas à 20 ans et dans 73 % des cas à 30 ans, avec une survie après survenue de la maladie myéloblastique uniquement si une allogreffe est réalisée en complément du traitement par chimiothérapie (9).

Aspect fonctionnel des mutations de *GATA2*

Actuellement, peu d'éléments fonctionnels permettent de comprendre le lien entre la mutation de *GATA2*, la variabilité du phénotype hématologique et immuno- logique, parfois au sein d'une même famille, et le délai d'apparition quelquefois tardif du déficit immunitaire. La variété des mutations (mutations faux-sens et non-sens, délétions totales, délétion de l'*enhancer* de l'intron 4) suggère préférentiellement un mécanisme d'haploinsuffisance, même si un mécanisme de dominance négative ne peut être exclu pour certaines mutations cliniques (figure).

Deux publications récentes ont mis en évidence un défaut d'hématopoïèse précoce fœtale et adulte chez la souris présentant une inactivation conditionnelle d'un *enhancer* ou une délétion hétérozygote d'un site de liaison à l'ADN (17, 18). L'hypothèse actuelle serait une attrition progressive du réservoir de CSH et de progéniteurs débutant dès l'embryogenèse et se poursuivant pendant l'enfance et la période adulte jeune. E.M. Mace et al. (19) rapportent le rôle majeur de *GATA2* dans la maturation des cellules NK, et spécifiquement dans le maintien du pool *CD56 bright*. *GATA2* est également

essentiel au développement vasculaire lymphatique endothélial, conduisant chez la souris à un décès précoce (E16.5) des embryons par œdème et hémorragie après modélisation de la délétion de l'*enhancer* +9,5 kb retrouvée chez un patient MonoMAC (17, 18).

Conclusion

Les auteurs déclarent
ne pas avoir de liens
d'intérêts.

Les syndromes de prédisposition aux hémopathies myéloïdes associés aux mutations de *GATA2* sont souvent liés à un déficit immunitaire, une atteinte

vasculaire, et l'histoire familiale permet de mettre en évidence un *pattern* autosomique dominant. La reconnaissance de ces syndromes est essentielle afin de proposer une prise en charge adaptée au patient, un dépistage des apparentés, notamment quand une allogreffe de moelle intrafamiliale est indiquée. Par ailleurs, la reconnaissance de ces syndromes de prédisposition associés aux mutations de *GATA2* ouvre de nombreuses possibilités en termes de conseil génétique et de diagnostic anténatal, et ce, compte tenu de la gravité de l'atteinte hématologique et du déficit immunitaire. ■

RÉFÉRENCES

1. Wilson NK, Foster SD, Wang X et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 2010;7(4):532-44.
2. Tsai FY, Keller G, Kuo FC et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor *GATA-2*. *Nature* 1994;371(6494):221-6.
3. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP et al. *GATA-2* plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2004;200(7):871-82.
4. Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R et al. Haploinsufficiency of *GATA-2* perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 2005;106(2):477-84.
5. Doré LC, Chlon TM, Brown CD et al. Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide *GATA* factor switching during hematopoiesis. *Blood* 2012;119(16):3724-33.
6. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor *GATA-2* is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89(10):3636-43.
7. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR et al. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor *GATA-1*. *Blood* 2004;104(10):3136-47.
8. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL et al. *GATA2* haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* 2013;121(19):3830-7.
9. Pasquet M, Bellanné-Chantelot C, Tavities S et al. High frequency of *GATA2* mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(5):822-9.
10. Emberger JM, Navarro M, Dejean M et al. Deaf-mutism, lymphedema of the lower limbs and hematological abnormalities (acute leukemia, cytopenia) with autosomal dominant transmission. *J Genet Hum* 1979;27(3):237-45.
11. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ et al. Loss-of-function germline *GATA2* mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for *GATA2* in the lymphatic vasculature. *Blood* 2012;119(5):1283-91.
12. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J et al. Mutations in *GATA2* are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* 2011;118(10):2653-5.
13. Vinh DC, Patel SY, Uzel G et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 2010;115(8):1519-29.
14. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V et al. Exome sequencing identifies *GATA-2* mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* 2011;118(10):2656-8.
15. Mutsaers PG, van de Loosdrecht AA, Tawana K et al. Highly variable clinical manifestations in a large family with a novel *GATA2* mutation. *Leukemia* 2013 (Epub ahead of print).
16. Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, Freeman AF et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for *GATA2* deficiency. *Blood* 2011;118(13):3715-20.
17. Lim KC, Hosoya T, Brandt W et al. Conditional *Gata2* inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *J Clin Invest* 2012;122(10):3705-17.
18. Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ et al. Cis-element mutated in *GATA2*-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2012;122(10):3692-704.
19. Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L et al. Mutations in *GATA2* cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56 (bright) subset. *Blood* 2013;121(14):2669-77.

Prochain numéro



Parution en décembre

Dossier thématique :

**Darwin et l'hématologie :
la clonalité revisitée**

Coordonné par Marie-Christine Béné

Abonnez-vous sur www.edimark.fr

Bibliographie

1. Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol*. 2015;169(2):173-187.
2. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(10):1012-1017.
3. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood*. 2014;123(6):809-821.
4. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(5):822-829.
5. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994;371(6494):221-226.
6. Weiss MJ, Orkin SH. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1995;23(2):99-107.
7. Wilson NK, Foster SD, Wang X, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):532-544.
8. Dorshkind K. Not a split decision for human hematopoiesis. *Nat Immunol*. 2010;11(7):569-570.
9. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. 2010;11(7):585-593.
10. Schepers K, Campbell TB, Passegue E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):254-267.
11. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93-106.
12. Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(22):7580-7584.
13. Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell*. 2010;140(5):744-752.
14. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-278.
15. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737.
16. Krause DS, Fulzele K, Catic A, et al. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. *Nat Med*. 2013;19(11):1513-1517.
17. Santaguida M, Schepers K, King B, et al. JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal. *Cancer Cell*. 2009;15(4):341-352.
18. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-823.
19. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8283-8288.

20. Kim HG, Kojima K, Swindle CS, et al. FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(3):1567-1574.
21. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol*. 2014;2014:103175.
22. Chalandon Y, Schwaller J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2005;90(7):949-968.
23. Holme H, Hossain U, Kirwan M, Walne A, Vulliamy T, Dokal I. Marked genetic heterogeneity in familial myelodysplasia/acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;158(2):242-248.
24. Churpek JE, Godley LA. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016.
25. Horwitz M, Benson KF, Li FQ, et al. Genetic heterogeneity in familial acute myelogenous leukemia: evidence for a second locus at chromosome 16q21-23.2. *Am J Hum Genet*. 1997;61(4):873-881.
26. Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol*. 2000;110(4):768-779.
27. Donadieu J, Leblanc T, Bader Meunier B, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica*. 2005;90(1):45-53.
28. Aktas D, Koc A, Boduroglu K, Hicsonmez G, Tuncbilek E. Myelodysplastic syndrome associated with monosomy 7 in a child with Bloom syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;116(1):44-46.
29. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101(4):1249-1256.
30. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(8):2412-2421.
31. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica*. 2011;96(10):1536-1542.
32. Michaud J, Simpson KM, Escher R, et al. Integrative analysis of RUNX1 downstream pathways and target genes. *BMC Genomics*. 2008;9:363.
33. Kagoshima H, Akamatsu Y, Ito Y, Shigesada K. Functional dissection of the alpha and beta subunits of transcription factor PEBP2 and the redox susceptibility of its DNA binding activity. *J Biol Chem*. 1996;271(51):33074-33082.
34. Telfer JC, Rothenberg EV. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev Biol*. 2001;229(2):363-382.
35. Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol*. 1994;14(1):373-381.
36. Cockerill PN, Osborne CS, Bert AG, Grotto RJ. Regulation of GM-CSF gene transcription by core-binding factor. *Cell Growth Differ*. 1996;7(7):917-922.
37. Austin GE, Zhao WG, Regmi A, Lu JP, Braun J. Identification of an upstream enhancer containing an AML1 site in the human myeloperoxidase (MPO) gene. *Leuk Res*. 1998;22(11):1037-1048.
38. Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol*. 1994;14(8):5558-5568.
39. Downton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood*. 1985;65(3):557-563.
40. Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE, Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(4):254-269.
41. Ganly P, Walker LC, Morris CM. Familial mutations of the transcription factor RUNX1 (AML1, CBF2) predispose to acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(1):1-10.

42. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*. 2008;112(12):4639-4645.
43. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, et al. Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:49.
44. Ho CY, Otterud B, Legare RD, et al. Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2. *Blood*. 1996;87(12):5218-5224.
45. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*. 1999;23(2):166-175.
46. Michaud J, Wu F, Osato M, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*. 2002;99(4):1364-1372.
47. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood*. 2009;113(22):5583-5587.
48. Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica*. 2008;93(1):155-156.
49. Shinawi M, Erez A, Shardy DL, et al. Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. *Blood*. 2008;112(4):1042-1047.
50. Jongmans MC, Kuiper RP, Carmichael CL, et al. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia*. 2010;24(1):242-246.
51. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi KL, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(22):2484-2490.
52. Haslam K, Langabeer SE, Hayat A, Conneally E, Vandenberghe E. Targeted next-generation sequencing of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;175(1):161-163.
53. Sakurai M, Kunitomo H, Watanabe N, et al. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*. 2014;28(12):2344-2354.
54. Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, et al. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun*. 2014;5:4770.
55. Antony-Debre I, Duployez N, Bucci M, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(4):999-1002.
56. Antony-Debre I, Manchev VT, Balayn N, et al. Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood*. 2015;125(6):930-940.
57. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84(2):321-330.
58. Robin C, Ottersbach K, Durand C, et al. An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev Cell*. 2006;11(2):171-180.
59. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(8):3444-3449.
60. North T, Gu TL, Stacy T, et al. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development*. 1999;126(11):2563-2575.
61. Gowney JD, Shigematsu H, Li Z, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood*. 2005;106(2):494-504.

62. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 2004;10(3):299-304.
63. Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N, Buchholz F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene*. 2006;25(6):929-939.
64. Chin DW, Sakurai M, Nah GS, et al. RUNX1 haploinsufficiency results in granulocyte colony-stimulating factor hypersensitivity. *Blood Cancer J*. 2016;6:e379.
65. Buijs A, Poddighe P, van Wijk R, et al. A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood*. 2001;98(9):2856-2858.
66. Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, et al. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics*. 1992;14(1):12-17.
67. Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9606-9610.
68. Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, et al. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev*. 1989;3(8):1146-1156.
69. Leutz A, Pless O, Lappe M, Dittmar G, Kowenz-Leutz E. Crosstalk between phosphorylation and multi-site arginine/lysine methylation in C/EBPs. *Transcription*. 2011;2(1):3-8.
70. Yamaguchi Y, Nishio H, Kishi K, Ackerman SJ, Suda T. C/EBPbeta and GATA-1 synergistically regulate activity of the eosinophil granule major basic protein promoter: implication for C/EBPbeta activity in eosinophil gene expression. *Blood*. 1999;94(4):1429-1439.
71. Kovacs KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36959-36965.
72. Reckzeh K, Cammenga J. Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPalpha in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2010;91(4):557-568.
73. Behre G, Singh SM, Liu H, et al. Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem*. 2002;277(29):26293-26299.
74. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*. 2011;54(1):6-19.
75. Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol*. 2007;17(7):318-324.
76. Radomska HS, Basseres DS, Zheng R, et al. Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J Exp Med*. 2006;203(2):371-381.
77. Pal P, Lochab S, Kanaujiya JK, et al. E6AP, an E3 ubiquitin ligase negatively regulates granulopoiesis by targeting transcription factor C/EBPalpha for ubiquitin-mediated proteasome degradation. *Cell Death Dis*. 2013;4:e590.
78. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 2002;100(8):2717-2723.
79. Shih LY, Huang CF, Lin TL, et al. Heterogeneous patterns of CEBPalpha mutation status in the progression of myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia to acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1821-1826.
80. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia*. 2014;28(4):794-803.
81. Greif PA, Dufour A, Konstandin NP, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120(2):395-403.

82. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. 2005;19(3):329-334.
83. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2001;27(3):263-270.
84. Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, et al. Modeling of C/EBPalpha mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell*. 2008;13(4):299-310.
85. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(23):2403-2407.
86. Tawana K, Wang J, Renneville A, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood*. 2015;126(10):1214-1223.
87. Heath V, Suh HC, Holman M, et al. C/EBPalpha deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood*. 2004;104(6):1639-1647.
88. Suh HC, Gooya J, Renn K, Friedman AD, Johnson PF, Keller JR. C/EBPalpha determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation. *Blood*. 2006;107(11):4308-4316.
89. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(2):569-574.
90. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity*. 2004;21(6):853-863.
91. Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultschi AI. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*. 1999;13(11):1398-1411.
92. Bereshchenko O, Mancini E, Moore S, et al. Hematopoietic stem cell expansion precedes the generation of committed myeloid leukemia-initiating cells in C/EBPalpha mutant AML. *Cancer Cell*. 2009;16(5):390-400.
93. Renneville A, Boissel N, Gachard N, et al. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication. *Blood*. 2009;113(21):5090-5093.
94. Sellick GS, Pritchard-Jones K, Shepherd V, Swansbury J, Catovsky D, Houlston RS. Loci other than 21q22.12 (RUNX1) and 16q21-23.2 cause familial AML. *Leukemia*. 2005;19(3):465-466.
95. Kwong YL, Ng MH, Ma SK. Familial acute myeloid leukemia with monosomy 7: late onset and involvement of a multipotential progenitor cell. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;116(2):170-173.
96. Minelli A, Maserati E, Giudici G, et al. Familial partial monosomy 7 and myelodysplasia: different parental origin of the monosomy 7 suggests action of a mutator gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;124(2):147-151.
97. Savage P, Frenck R, Paderanga D, Emperor J, Shannon KM. Parental origins of chromosome 7 loss in childhood monosomy 7 syndrome. *Leukemia*. 1994;8(3):485-489.
98. Gaitonde S, Boumendjel R, Angeles R, Rondelli D. Familial childhood monosomy 7 and associated myelodysplasia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32(6):e236-237.
99. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, et al. Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *Am J Hum Genet*. 2012;90(5):888-892.
100. Lewinsohn M, Brown AL, Weinell LM, et al. Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood*. 2016;127(8):1017-1023.
101. Noris P, Favier R, Alessi MC, et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood*. 2013;122(11):1987-1989.

102. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015;27(5):658-670.
103. Bluteau D, Balduini A, Balayn N, et al. Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest*. 2014;124(2):580-591.
104. Cardoso SR, Ryan G, Walne AJ, et al. Germline heterozygous DDX41 variants in a subset of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016.
105. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet*. 2015;47(2):180-185.
106. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 1992;80(3):575-581.
107. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339(6224):446-451.
108. Molkenkin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2000;275(50):38949-38952.
109. Zon LI, Mather C, Burgess S, Bolce ME, Harland RM, Orkin SH. Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10642-10646.
110. Lowry JA, Atchley WR. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol*. 2000;50(2):103-115.
111. Shimizu R, Yamamoto M. GATA-related hematologic disorders. *Exp Hematol*. 2016;44(8):696-705.
112. Trainor CD, Omichinski JG, Vandergon TL, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G. A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol Cell Biol*. 1996;16(5):2238-2247.
113. Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M. GATA factor switching during erythroid differentiation. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(3):163-168.
114. Heberlein C, Fischer KD, Stoffel M, et al. The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonal stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol Cell Biol*. 1992;12(4):1815-1826.
115. Mignotte V, Wall L, deBoer E, Grosveld F, Romeo PH. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(1):37-54.
116. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10638-10641.
117. Strauss EC, Andrews NC, Higgs DR, Orkin SH. In vivo footprinting of the human alpha-globin locus upstream regulatory element by guanine and adenine ligation-mediated polymerase chain reaction. *Mol Cell Biol*. 1992;12(5):2135-2142.
118. Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*. 1990;344(6265):447-449.
119. Fujiwara Y, Chang AN, Williams AM, Orkin SH. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*. 2004;103(2):583-585.
120. Takahashi S, Shimizu R, Suwabe N, et al. GATA factor transgenes under GATA-1 locus control rescue germline GATA-1 mutant deficiencies. *Blood*. 2000;96(3):910-916.
121. Shimizu R, Yamamoto M. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(1):129-136.
122. Onodera K, Takahashi S, Nishimura S, et al. GATA-1 transcription is controlled by distinct regulatory mechanisms during primitive and definitive erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4487-4492.

123. Kobayashi M, Nishikawa K, Yamamoto M. Hematopoietic regulatory domain of gata1 gene is positively regulated by GATA1 protein in zebrafish embryos. *Development*. 2001;128(12):2341-2350.
124. Migliaccio AR, Rana RA, Sanchez M, et al. GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1^{low} mouse mutant. *J Exp Med*. 2003;197(3):281-296.
125. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. 1997;16(13):3965-3973.
126. Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev*. 1994;8(10):1184-1197.
127. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9623-9627.
128. Yu C, Cantor AB, Yang H, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*. 2002;195(11):1387-1395.
129. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-197.
130. Kobayashi M, Yamamoto M. Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem*. 2007;142(1):1-10.
131. Orkin SH, Zon LI. Genetics of erythropoiesis: induced mutations in mice and zebrafish. *Annu Rev Genet*. 1997;31:33-60.
132. Pevny L, Simon MC, Robertson E, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991;349(6306):257-260.
133. Simon MC, Pevny L, Wiles MV, Keller G, Costantini F, Orkin SH. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 1992;1(2):92-98.
134. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12355-12358.
135. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, Yang H, Orkin SH. A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(13):6781-6785.
136. Kulesa H, Frampton J, Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev*. 1995;9(10):1250-1262.
137. Ohneda K, Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*. 2002;108(4):237-245.
138. Nishimura S, Takahashi S, Kuroha T, et al. A GATA box in the GATA-1 gene hematopoietic enhancer is a critical element in the network of GATA factors and sites that regulate this gene. *Mol Cell Biol*. 2000;20(2):713-723.
139. Shimizu R, Hasegawa A, Ottolenghi S, Ronchi A, Yamamoto M. Verification of the in vivo activity of three distinct cis-acting elements within the Gata1 gene promoter-proximal enhancer in mice. *Genes Cells*. 2013;18(11):1032-1041.
140. Doré LC, Chlon TM, Brown CD, White KP, Crispino JD. Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide GATA factor switching during hematopoiesis. *Blood*. 2012;119(16):3724-3733.
141. Fujiwara T, O'Geen H, Keles S, et al. Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell*. 2009;36(4):667-681.
142. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*. 1997;90(1):109-119.
143. Cantor AB, Katz SG, Orkin SH. Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol Cell Biol*. 2002;22(12):4268-4279.
144. Letting DL, Chen YY, Rakowski C, Reedy S, Blobel GA. Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(2):476-481.

145. Crispino JD, Lodish MB, MacKay JP, Orkin SH. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell*. 1999;3(2):219-228.
146. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
147. Lee HY, Johnson KD, Fujiwara T, Boyer ME, Kim SI, Bresnick EH. Controlling hematopoiesis through sumoylation-dependent regulation of a GATA factor. *Mol Cell*. 2009;36(6):984-995.
148. Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(5):2061-2066.
149. Stumpf M, Waskow C, Krotschel M, et al. The mediator complex functions as a coactivator for GATA-1 in erythropoiesis via subunit Med1/TRAP220. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(49):18504-18509.
150. Kim SI, Bultman SJ, Kiefer CM, Dean A, Bresnick EH. BRG1 requirement for long-range interaction of a locus control region with a downstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2259-2264.
151. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J*. 1997;16(11):3145-3157.
152. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem*. 2010;285(41):31087-31093.
153. Chang AN, Cantor AB, Fujiwara Y, et al. GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9237-9242.
154. Crispino JD. GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(1):137-147.
155. Wan YY. GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends Immunol*. 2014;35(6):233-242.
156. Frelin C, Herrington R, Janmohamed S, et al. GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1037-1044.
157. Ku CJ, Hosoya T, Maillard I, Engel JD. GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood*. 2012;119(10):2242-2251.
158. Grote D, Boualia SK, Souabni A, et al. Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genet*. 2008;4(12):e1000316.
159. Cook KD, Miller J. TCR-dependent translational control of GATA-3 enhances Th2 differentiation. *J Immunol*. 2010;185(6):3209-3216.
160. Li J, Wang Z, Hu S, Zhao X, Cao L. Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Immunol Lett*. 2013;154(1-2):42-48.
161. Notani D, Gottimukkala KP, Jayani RS, et al. Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner. *PLoS Biol*. 2010;8(1):e1000296.
162. Scheinman EJ, Avni O. Transcriptional regulation of GATA3 in T helper cells by the integrated activities of transcription factors downstream of the interleukin-4 receptor and T cell receptor. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3037-3048.
163. Ranganath S, Murphy KM. Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development. *Mol Cell Biol*. 2001;21(8):2716-2725.
164. Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, et al. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet*. 1995;11(1):40-44.
165. Samson SI, Richard O, Tavian M, et al. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity*. 2003;19(5):701-711.
166. Mjosberg J, Bernink J, Golebski K, et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity*. 2012;37(4):649-659.

167. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1045-1054.
168. Hosoya T, Kuroha T, Moriguchi T, et al. GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. *J Exp Med*. 2009;206(13):2987-3000.
169. Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature*. 1996;384(6608):474-478.
170. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89(4):587-596.
171. Hoflinger S, Kesavan K, Fuxa M, et al. Analysis of Notch1 function by in vitro T cell differentiation of Pax5 mutant lymphoid progenitors. *J Immunol*. 2004;173(6):3935-3944.
172. Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol*. 2011;23(7):415-420.
173. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998;9(5):745-755.
174. Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*. 2003;18(3):415-428.
175. Wei G, Abraham BJ, Yagi R, et al. Genome-wide analyses of transcription factor GATA3-mediated gene regulation in distinct T cell types. *Immunity*. 2011;35(2):299-311.
176. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157-163.
177. Ciocca V, Daskalakis C, Ciocca RM, Ruiz-Orrico A, Palazzo JP. The significance of GATA3 expression in breast cancer: a 10-year follow-up study. *Hum Pathol*. 2009;40(4):489-495.
178. Usary J, Llaca V, Karaca G, et al. Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene*. 2004;23(46):7669-7678.
179. Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, et al. The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood*. 1999;93(12):4196-4207.
180. Pan X, Minegishi N, Harigae H, et al. Identification of human GATA-2 gene distal IS exon and its expression in hematopoietic stem cell fractions. *J Biochem*. 2000;127(1):105-112.
181. Vicente C, Conchillo A, Garcia-Sanchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;82(1):1-17.
182. Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):8811-8816.
183. Grass JA, Jing H, Kim SI, et al. Distinct functions of dispersed GATA factor complexes at an endogenous gene locus. *Mol Cell Biol*. 2006;26(19):7056-7067.
184. Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3692-3704.
185. Lim KC, Hosoya T, Brandt W, et al. Conditional Gata2 inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3705-3717.
186. Snow JW, Trowbridge JJ, Johnson KD, et al. Context-dependent function of "GATA switch" sites in vivo. *Blood*. 2011;117(18):4769-4772.
187. Snow JW, Trowbridge JJ, Fujiwara T, et al. A single cis element maintains repression of the key developmental regulator Gata2. *PLoS Genet*. 2010;6(9):e1001103.
188. Khandekar M, Brandt W, Zhou Y, et al. A Gata2 intronic enhancer confers its pan-endothelial-specific regulation. *Development*. 2007;134(9):1703-1712.
189. Gao X, Johnson KD, Chang YI, et al. Gata2 cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J Exp Med*. 2013;210(13):2833-2842.
190. Johnson KD, Kong G, Gao X, et al. Cis-regulatory mechanisms governing stem and progenitor cell transitions. *Sci Adv*. 2015;1(8):e1500503.

191. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol*. 2014;100(5):417-424.
192. Lulli V, Romania P, Morsilli O, et al. Overexpression of Ets-1 in human hematopoietic progenitor cells blocks erythroid and promotes megakaryocytic differentiation. *Cell Death Differ*. 2006;13(7):1064-1074.
193. Maeno M, Mead PE, Kelley C, et al. The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood*. 1996;88(6):1965-1972.
194. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, et al. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*. 2001;98(12):3283-3289.
195. Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity*. 2002;17(5):665-676.
196. Yuasa H, Oike Y, Iwama A, et al. Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *EMBO J*. 2005;24(11):1976-1987.
197. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J*. 2002;16(13):1811-1813.
198. Sanalkumar R, Johnson KD, Gao X, et al. Mechanism governing a stem cell-generating cis-regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(12):E1091-1100.
199. Shimahara A, Yamakawa N, Nishikata I, Morishita K. Acetylation of lysine 564 adjacent to the C-terminal binding protein-binding motif in EVI1 is crucial for transcriptional activation of GATA2. *J Biol Chem*. 2010;285(22):16967-16977.
200. Malik J, Getman M, Steiner LA. Histone methyltransferase Setd8 represses Gata2 expression and regulates erythroid maturation. *Mol Cell Biol*. 2015;35(12):2059-2072.
201. Ozawa Y, Towatari M, Tsuzuki S, et al. Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. *Blood*. 2001;98(7):2116-2123.
202. Pase L, Layton JE, Kloosterman WP, Carradice D, Waterhouse PM, Lieschke GJ. miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2. *Blood*. 2009;113(8):1794-1804.
203. Ahn EE, Higashi T, Yan M, et al. SON protein regulates GATA-2 through transcriptional control of the microRNA 23a~27a~24-2 cluster. *J Biol Chem*. 2013;288(8):5381-5388.
204. Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, et al. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood*. 2003;102(3):896-905.
205. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(2):706-715.
206. Towatari M, May GE, Marais R, et al. Regulation of GATA-2 phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and interleukin-3. *J Biol Chem*. 1995;270(8):4101-4107.
207. Hayakawa F, Towatari M, Ozawa Y, Tomita A, Privalsky ML, Saito H. Functional regulation of GATA-2 by acetylation. *J Leukoc Biol*. 2004;75(3):529-540.
208. Chun TH, Itoh H, Subramanian L, Iniguez-Lluhi JA, Nakao K. Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. *Circ Res*. 2003;92(11):1201-1208.
209. Minegishi N, Suzuki N, Kawatani Y, Shimizu R, Yamamoto M. Rapid turnover of GATA-2 via ubiquitin-proteasome protein degradation pathway. *Genes Cells*. 2005;10(7):693-704.
210. Menghini R, Marchetti V, Cardellini M, et al. Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation*. 2005;111(15):1946-1953.
211. Koga S, Yamaguchi N, Abe T, et al. Cell-cycle-dependent oscillation of GATA2 expression in hematopoietic cells. *Blood*. 2007;109(10):4200-4208.
212. Lurie LJ, Boyer ME, Grass JA, Bresnick EH. Differential GATA factor stabilities: implications for chromatin occupancy by structurally similar transcription factors. *Biochemistry*. 2008;47(3):859-869.

213. Pal S, Cantor AB, Johnson KD, et al. Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(4):980-985.
214. Wozniak RJ, Keles S, Lugus JJ, et al. Molecular hallmarks of endogenous chromatin complexes containing master regulators of hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2008;28(21):6681-6694.
215. Zhang P, Behre G, Pan J, et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8705-8710.
216. Kitajima K, Masuhara M, Era T, Enver T, Nakano T. GATA-2 and GATA-2/ER display opposing activities in the development and differentiation of blood progenitors. *EMBO J*. 2002;21(12):3060-3069.
217. Tsuzuki S, Kitajima K, Nakano T, Glasow A, Zelent A, Enver T. Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2. *Mol Cell Biol*. 2004;24(15):6824-6836.
218. Tsuzuki S, Enver T. Interactions of GATA-2 with the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, its homologue FAZF, and the t(11;17)-generated PLZF-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Blood*. 2002;99(9):3404-3410.
219. Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. 2000;290(5489):134-138.
220. Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, Tenen DG. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(17):7932-7936.
221. Li L, Jothi R, Cui K, et al. Nuclear adaptor Ldb1 regulates a transcriptional program essential for the maintenance of hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2011;12(2):129-136.
222. Mikkola HK, Klintman J, Yang H, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*. 2003;421(6922):547-551.
223. Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J*. 1996;15(16):4123-4129.
224. Gottgens B, Barton LM, Chapman MA, et al. Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene (SCL)--comparative analysis of five vertebrate SCL loci. *Genome Res*. 2002;12(5):749-759.
225. Ghatpande S, Ghatpande A, Sher J, Zile MH, Evans T. Retinoid signaling regulates primitive (yolk sac) hematopoiesis. *Blood*. 2002;99(7):2379-2386.
226. Pimanda JE, Donaldson IJ, de Bruijn MF, et al. The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):840-845.
227. Robert-Moreno A, Espinosa L, de la Pompa JL, Bigas A. RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development*. 2005;132(5):1117-1126.
228. Pimanda JE, Ottersbach K, Knezevic K, et al. Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(45):17692-17697.
229. Oren T, Torregroza I, Evans T. An Oct-1 binding site mediates activation of the gata2 promoter by BMP signaling. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):4357-4367.
230. Lugus JJ, Chung YS, Mills JC, et al. GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development*. 2007;134(2):393-405.
231. Nottingham WT, Jarratt A, Burgess M, et al. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood*. 2007;110(13):4188-4197.
232. Lohmann F, Bieker JJ. Activation of Eklf expression during hematopoiesis by Gata2 and Smad5 prior to erythroid commitment. *Development*. 2008;135(12):2071-2082.
233. Yamazaki M, Fukushima H, Shin M, et al. Tumor necrosis factor alpha represses bone morphogenetic protein (BMP) signaling by interfering with the DNA binding of Smads through the activation of NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35987-35995.
234. Billing M, Rorby E, May G, et al. A network including TGFbeta/Smad4, Gata2, and p57 regulates proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2016;44(5):399-409 e395.

235. Guo Y, Fu X, Huo B, et al. GATA2 regulates GATA1 expression through LSD1-mediated histone modification. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):2265-2274.
236. Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, et al. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood*. 2016;128(4):508-518.
237. Orlic D, Anderson S, Biesecker LG, Sorrentino BP, Bodine DM. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(10):4601-4605.
238. Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, et al. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood*. 2005;106(2):477-484.
239. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 1997;89(10):3636-3643.
240. Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(2):1279-1285.
241. Kazenwadel J, Betterman KL, Chong CE, et al. GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. *J Clin Invest*. 2015;125(8):2979-2994.
242. Kumar MS, Hancock DC, Molina-Arcas M, et al. The GATA2 transcriptional network is requisite for RAS oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Cell*. 2012;149(3):642-655.
243. Lee ME, Temizer DH, Clifford JA, Quertermous T. Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 1991;266(24):16188-16192.
244. Craven SE, Lim KC, Ye W, Engel JD, de Sauvage F, Rosenthal A. Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development*. 2004;131(5):1165-1173.
245. Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, et al. Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*. 1999;97(5):587-598.
246. Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY, Orkin SH. Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol*. 1999;210(2):305-321.
247. Ng YK, George KM, Engel JD, Linzer DI. GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene. *Development*. 1994;120(11):3257-3266.
248. Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, et al. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 2014;99(11):1686-1696.
249. Okitsu Y, Takahashi S, Minegishi N, et al. Regulation of adipocyte differentiation of bone marrow stromal cells by transcription factor GATA-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364(2):383-387.
250. Kelley C, Yee K, Harland R, Zon LI. Ventral expression of GATA-1 and GATA-2 in the *Xenopus* embryo defines induction of hematopoietic mesoderm. *Dev Biol*. 1994;165(1):193-205.
251. Persons DA, Allay JA, Allay ER, et al. Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood*. 1999;93(2):488-499.
252. Ferreira R, Wai A, Shimizu R, et al. Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood*. 2007;109(12):5481-5490.
253. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, et al. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*. 2004;104(10):3136-3147.
254. Dong XM, Yin RH, Yang Y, et al. GATA-2 inhibits transforming growth factor-beta signaling pathway through interaction with Smad4. *Cell Signal*. 2014;26(5):1089-1097.
255. Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(23):10235-10250.
256. Mimoto MS, Kwon S, Green YS, Goldman D, Christian JL. GATA2 regulates Wnt signaling to promote primitive red blood cell fate. *Dev Biol*. 2015;407(1):1-11.

257. Briegel K, Lim KC, Plank C, Beug H, Engel JD, Zenke M. Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev.* 1993;7(6):1097-1109.
258. Terui K, Takahashi Y, Kitazawa J, Toki T, Yokoyama M, Ito E. Expression of transcription factors during megakaryocytic differentiation of CD34+ cells from human cord blood induced by thrombopoietin. *Tohoku J Exp Med.* 2000;192(4):259-273.
259. Visvader JE, Crossley M, Hill J, Orkin SH, Adams JM. The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line. *Mol Cell Biol.* 1995;15(2):634-641.
260. Huang Z, Dore LC, Li Z, et al. GATA-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of GATA-1. *Mol Cell Biol.* 2009;29(18):5168-5180.
261. Stachura DL, Chou ST, Weiss MJ. Early block to erythromegakaryocytic development conferred by loss of transcription factor GATA-1. *Blood.* 2006;107(1):87-97.
262. Chou ST, Khandros E, Bailey LC, et al. Graded repression of PU.1/Sfpi1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood.* 2009;114(5):983-994.
263. Cantor AB, Iwasaki H, Arinobu Y, et al. Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage. *J Exp Med.* 2008;205(3):611-624.
264. Ohmori S, Moriguchi T, Noguchi Y, et al. GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow. *Blood.* 2015;125(21):3306-3315.
265. Wilson DB, Dorfman DM, Orkin SH. A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 1990;10(9):4854-4862.
266. Zhu C, Smith T, McNulty J, et al. Evaluation and application of modularly assembled zinc-finger nucleases in zebrafish. *Development.* 2011;138(20):4555-4564.
267. Gumina RJ, Kirschbaum NE, Piotrowski K, Newman PJ. Characterization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 promoter: identification of a GATA-2 binding element required for optimal transcriptional activity. *Blood.* 1997;89(4):1260-1269.
268. Jahroudi N, Lynch DC. Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol Cell Biol.* 1994;14(2):999-1008.
269. Kappel A, Schlaeger TM, Flamme I, Orkin SH, Risau W, Breier G. Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood.* 2000;96(9):3078-3085.
270. Mammoto A, Connor KM, Mammoto T, et al. A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature.* 2009;457(7233):1103-1108.
271. Minami T, Aird WC. Thrombin stimulation of the vascular cell adhesion molecule-1 promoter in endothelial cells is mediated by tandem nuclear factor-kappa B and GATA motifs. *J Biol Chem.* 2001;276(50):47632-47641.
272. Wozniak RJ, Boyer ME, Grass JA, Lee Y, Bresnick EH. Context-dependent GATA factor function: combinatorial requirements for transcriptional control in hematopoietic and endothelial cells. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14665-14674.
273. Zhang R, Min W, Sessa WC. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(25):15320-15326.
274. Marks-Bluth J, Khanna A, Chandrakanthan V, et al. SMAD1 and SMAD5 Expression Is Coordinately Regulated by FLI1 and GATA2 during Endothelial Development. *Mol Cell Biol.* 2015;35(12):2165-2172.
275. Kanki Y, Kohro T, Jiang S, et al. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *EMBO J.* 2011;30(13):2582-2595.
276. Linnemann AK, O'Geen H, Keles S, Farnham PJ, Bresnick EH. Genetic framework for GATA factor function in vascular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(33):13641-13646.

277. Gottgens B, Nastos A, Kinston S, et al. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 2002;21(12):3039-3050.
278. Ray S, Dutta D, Rumi MA, Kent LN, Soares MJ, Paul S. Context-dependent function of regulatory elements and a switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate Gata2 transcription during trophoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2009;284(8):4978-4988.
279. Caprioli A, Minko K, Drevon C, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F, Jaffredo T. Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Dev Biol.* 2001;238(1):64-78.
280. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, et al. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2004;200(7):871-882.
281. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature.* 2009;457(7231):887-891.
282. de Pater E, Kaimakis P, Vink CS, et al. Gata2 is required for HSC generation and survival. *J Exp Med.* 2013;210(13):2843-2850.
283. Rodrigues NP, Boyd AS, Fugazza C, et al. GATA-2 regulates granulocyte-macrophage progenitor cell function. *Blood.* 2008;112(13):4862-4873.
284. Tipping AJ, Pina C, Castor A, et al. High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. *Blood.* 2009;113(12):2661-2672.
285. Nandakumar SK, Johnson K, Throm SL, Pestina TI, Neale G, Persons DA. Low-level GATA2 overexpression promotes myeloid progenitor self-renewal and blocks lymphoid differentiation in mice. *Exp Hematol.* 2015;43(7):565-577 e561-510.
286. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood.* 2011;118(10):2653-2655.
287. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet.* 2011;43(10):929-931.
288. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood.* 2013;121(19):3830-3837, S3831-3837.
289. Celton M, Forest A, Gosse G, et al. Epigenetic regulation of GATA2 and its impact on normal karyotype acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2014;28(8):1617-1626.
290. Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(6):2076-2081.
291. Green CL, Tawana K, Hills RK, et al. GATA2 mutations in sporadic and familial acute myeloid leukaemia patients with CEBPA mutations. *Br J Haematol.* 2013;161(5):701-705.
292. Grossmann V, Haferlach C, Nadarajah N, et al. CEBPA double-mutated acute myeloid leukaemia harbours concomitant molecular mutations in 76.8% of cases with TET2 and GATA2 alterations impacting prognosis. *Br J Haematol.* 2013;161(5):649-658.
293. Marceau-Renaut A, Guihard S, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C, Cheok M. Classification of CEBPA mutated acute myeloid leukemia by GATA2 mutations. *Am J Hematol.* 2015;90(5):E93-94.
294. Theis F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Clinical impact of GATA2 mutations in acute myeloid leukemia patients harboring CEBPA mutations: a study of the AML study group. *Leukemia.* 2016.
295. Luesink M, Hollink IH, van der Velden VH, et al. High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012;120(10):2064-2075.
296. Vicente C, Vazquez I, Conchillo A, et al. Overexpression of GATA2 predicts an adverse prognosis for patients with acute myeloid leukemia and it is associated with distinct molecular abnormalities. *Leukemia.* 2012;26(3):550-554.
297. Ping N, Sun A, Song Y, et al. Exome sequencing identifies highly recurrent somatic GATA2 and CEBPA mutations in acute erythroid leukemia. *Leukemia.* 2016.

298. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood*. 2011;118(10):2656-2658.
299. Kaur J, Catovsky D, Valdimarsson H, Jensson O, Spiers AS. Familial acute myeloid leukaemia with acquired Pelger-Huet anomaly and aneuploidy of C group. *Br Med J*. 1972;4(5836):327-331.
300. Emberger JM, Navarro M, Dejean M, Izarn P. [Deaf-mutism, lymphedema of the lower limbs and hematological abnormalities (acute leukemia, cytopenia) with autosomal dominant transmission]. *J Genet Hum*. 1979;27(3):237-245.
301. Dickinson RE, Milne P, Jardine L, et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood*. 2014;123(6):863-874.
302. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood*. 2016;127(11):1387-1397; quiz 1518.
303. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood*. 2012;119(5):1283-1291.
304. Hsu AP, McReynolds LJ, Holland SM. GATA2 deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15(1):104-109.
305. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica*. 2014;99(2):276-281.
306. Calvo KR, Vinh DC, Maric I, et al. Myelodysplasia in autosomal dominant and sporadic monocytopenia immunodeficiency syndrome: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica*. 2011;96(8):1221-1225.
307. Bodor C, Renneville A, Smith M, et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica*. 2012;97(6):890-894.
308. Micol JB, Abdel-Wahab O. Collaborating constitutive and somatic genetic events in myeloid malignancies: ASXL1 mutations in patients with germline GATA2 mutations. *Haematologica*. 2014;99(2):201-203.
309. Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, et al. GATA2 and secondary mutations in familial myelodysplastic syndromes and pediatric myeloid malignancies. *Haematologica*. 2015;100(10):e398-401.
310. Beekman R, Valkhof MG, Sanders MA, et al. Sequential gain of mutations in severe congenital neutropenia progressing to acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(22):5071-5077.
311. Koegel AK, Hofmann I, Moffitt K, Degar B, Duncan C, Tubman VN. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with MonoMAC syndrome/GATA2 haploinsufficiency. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(10):1844-1847.
312. Stieglitz E, Liu YL, Emanuel PD, et al. Mutations in GATA2 are rare in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(9):1426-1427.
313. Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. *Blood*. 2015;125(1):56-70.
314. Bigley V, Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2011;96(8):1081-1083.
315. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med*. 2011;208(2):227-234.
316. Vinh DC, Patel SY, Uzel G, et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood*. 2010;115(8):1519-1529.
317. Cohen JL, Dropulic L, Hsu AP, et al. Association of GATA2 Deficiency With Severe Primary Epstein-Barr Virus (EBV) Infection and EBV-associated Cancers. *Clin Infect Dis*. 2016;63(1):41-47.

318. Camargo JF, Lobo SA, Hsu AP, Zerbe CS, Wormser GP, Holland SM. MonoMAC syndrome in a patient with a GATA2 mutation: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2013;57(5):697-699.
319. Spinner MA, Ker JP, Stoudenmire CJ, et al. GATA2 deficiency underlying severe blastomycosis and fatal herpes simplex virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(2):638-640.
320. Grossman J, Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(12):1940-1948.
321. Chou J, Lutskiy M, Tsitsikov E, Notarangelo LD, Geha RS, Dioun A. Presence of hypogammaglobulinemia and abnormal antibody responses in GATA2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(1):223-226.
322. Novakova M, Zaliouva M, Sukova M, et al. Loss of B cells and their precursors is the most constant feature of GATA-2 deficiency in childhood myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2016;101(6):707-716.
323. Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):575-583.
324. Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, et al. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood*. 2013;121(14):2669-2677.
325. Griesse M, Zarbock R, Costabel U, et al. GATA2 deficiency in children and adults with severe pulmonary alveolar proteinosis and hematologic disorders. *BMC Pulm Med*. 2015;15:87.
326. Svobodova T, Mejstrikova E, Salzer U, et al. Diffuse parenchymal lung disease as first clinical manifestation of GATA-2 deficiency in childhood. *BMC Pulm Med*. 2015;15:8.
327. Cuellar-Rodriguez J, Gea-Banacloche J, Freeman AF, et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Blood*. 2011;118(13):3715-3720.
328. Crall C, Morley KW, Rabinowits G, Schmidt B, Dioun Broyles A, Huang JT. Merkel cell carcinoma in a patient with GATA2 deficiency: a novel association with primary immunodeficiency. *Br J Dermatol*. 2016;174(1):169-171.
329. Delgado-Marquez AM, Zarco C, Ruiz R, Simarro A, Vanaclocha F. Severe disseminated primary herpes simplex infection as skin manifestation of GATA2 deficiency. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(7):1248-1250.
330. Johnson JA, Yu SS, Elist M, Arkfeld D, Panush RS. Rheumatologic manifestations of the "MonoMAC" syndrome. a systematic review. *Clin Rheumatol*. 2015;34(9):1643-1645.
331. Webb G, Chen YY, Li KK, et al. Single-gene association between GATA-2 and autoimmune hepatitis: A novel genetic insight highlighting immunologic pathways to disease. *J Hepatol*. 2016;64(5):1190-1193.
332. Rubel CA, Franco HL, Jeong JW, Lydon JP, DeMayo FJ. GATA2 is expressed at critical times in the mouse uterus during pregnancy. *Gene Expr Patterns*. 2012;12(5-6):196-203.
333. Zhang Y, Knutsen GR, Brown MD, Ruest LB. Control of endothelin-a receptor expression by progesterone is enhanced by synergy with Gata2. *Mol Endocrinol*. 2013;27(6):892-908.
334. Mir MA, Kochuparambil ST, Abraham RS, et al. Spectrum of myeloid neoplasms and immune deficiency associated with germline GATA2 mutations. *Cancer Med*. 2015;4(4):490-499.
335. Sicre de Fontbrune F, Ouchée M, Galambrun C, et al. Outcome of allogeneic stem cell transplantation for GATA2 deficiency (monoMAC syndrome): an analysis of 25 adults and children. *ESID congress*. 2016(e-poster).
336. Ciullini Mannurita S, Vignoli M, Colarusso G, et al. Timely follow-up of a GATA2 deficiency patient allows successful treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2016.
337. Niimi K, Kiyoi H, Ishikawa Y, et al. GATA2 zinc finger 2 mutation found in acute myeloid leukemia impairs myeloid differentiation. *Leuk Res Rep*. 2013;2(1):21-25.
338. Hahn CN, Brautigan PJ, Chong CE, et al. Characterisation of a compound in-cis GATA2 germline mutation in a pedigree presenting with myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with concurrent thrombocytopenia. *Leukemia*. 2015;29(8):1795-1797.

339. Saito Y, Boddupalli CS, Borsotti C, Manz MG. Dendritic cell homeostasis is maintained by nonhematopoietic and T-cell-produced Flt3-ligand in steady state and during immune responses. *Eur J Immunol.* 2013;43(6):1651-1658.
340. Cortes-Lavaud X, Landecho MF, Maicas M, et al. GATA2 germline mutations impair GATA2 transcription, causing haploinsufficiency: functional analysis of the p.Arg396Gln mutation. *J Immunol.* 2015;194(5):2190-2198.
341. Davis JN, McGhee L, Meyers S. The ETO (MTG8) gene family. *Gene.* 2003;303:1-10.
342. Tu S, Narendra V, Yamaji M, et al. Co-repressor CBFA2T2 regulates pluripotency and germline development. *Nature.* 2016;534(7607):387-390.
343. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, et al. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell.* 2014;25(4):415-427.
344. Crozatier M, Vincent A. Drosophila: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. *Dis Model Mech.* 2011;4(4):439-445.
345. Waltzer L, Bataille L, Peyrefitte S, Haenlin M. Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in Drosophila haematopoiesis. *EMBO J.* 2002;21(20):5477-5486.
346. Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, et al. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep.* 2016;17(4):1193-1205.

Mécanismes oncogéniques des mutations de GATA2 dans le développement des syndromes myélodysplasiques et des leucémies aigües myéloïdes familiales

Depuis 2011, des mutations hétérozygotes germinales du gène *GATA2* ont été identifiées chez des patients et familles, associées à des maladies hématologiques (myélodysplasie (MDS), leucémie aiguë myéloblastique (LAM)), immunologiques (déficit en cellules B, NK et monocytes (DMLC syndrome)) et vasculaires (syndrome d'Emberger, associant MDS et lymphœdème) ¹⁻³. Le gène *GATA2* code pour un facteur de transcription comportant 2 doigts de zinc essentiel dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices et des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

De nombreuses mutations différentes du gène *GATA2* ont été identifiées (mutations ponctuelles non-sens ou faux sens, larges délétions, délétions focales d'un enhancer dans l'intron 4) sans claire corrélation entre le génotype et le phénotype. Nous avons d'abord retrouvé, par séquençage des phases codantes (exome) au sein d'une famille de 4 patients suivis à Toulouse, une mutation *GATA2* R396Q. Dans un second temps, l'analyse d'une cohorte nationale a permis d'identifier des patients porteurs de mutations *GATA2* présentant des phénotypes cliniques de type DMLC, LAM et/ou MDS ⁴. Actuellement, plus de 80 patients ont été identifiés au niveau national.

Au niveau fonctionnel, nous avons initié l'analyse de 2 mutations ayant des conséquences clairement distinctes : la mutation R204X qui conduit à un codon stop dans le domaine précédant le premier doigt de zinc et la mutation ponctuelle R396Q, faux sens, située à la fin du deuxième doigt de zinc. Les modèles de différenciation *in vitro* en milieu semi-solide à partir de progéniteurs hématopoïétiques transduits par un vecteur rétroviral ont montré que les cellules transduites avec le mutant R396Q restent bloquées à un stade précoce de différenciation granulo-monocytaire, confirmé par l'analyse cytologique (aspect de myéloblastes). Le mutant R204X ne montre aucun effet différentiel en comparaison des cellules transduites par *GATA2* sauvage. Le mutant R396Q, à la différence du mutant R204X, peut induire une transformation leucémique des cellules *in vitro* lors de réensemencements sériels des progéniteurs transduits. Ces cellules peuvent être cultivées indéfiniment en milieu liquide sans cytokines, initiant une lignée leucémique. La localisation cellulaire de ces 2 protéines mutantes est distincte, nucléaire pour le mutant R396Q (identique à la protéine normale) et cytoplasmique pour le mutant R204X par perte probable du signal de localisation nucléaire. L'analyse transcriptomique a retrouvé un panel de gènes différenciellement exprimés entre le mutant R396Q et le gène sauvage.

Différents modèles animaux sont développés. Deux modèles murins, un de reconstitution hématopoïétique après transduction et un modèle knock-in inductible, sont en cours. La première expérience de reconstitution hématopoïétique n'a pas permis de mettre en évidence de phénotype leucémique après 6 mois de suivi, par probable rétention intramédullaire et différenciation terminale des cellules transduites. Nous avons également initié une collaboration permettant d'analyser l'effet des mutations de *GATA2* ou équivalents ontogéniques (*serpent*, *pannier*) dans la drosophile. Les protéines GATA sont ainsi très conservées au cours de l'évolution et dans la drosophile, les protéines de la famille GATA ont un rôle essentiel dans la différenciation du système hématopoïétique de cet animal.

Directeur de thèse : Pr Eric Delabesse

Unité de recherche : CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien CS 53717 31037 TOULOUSE CEDEX 1